UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DE MÉDECINE

N° 23

LES METHODES DE CULTURE
DU BACILLE DE KOCH
appliquées au Diagnostic de la Tuberculose

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 12 Mars 1938

PAR

René DELMAS

Né le 10 Janvier 1912, à Montpellier (Hérault)

Pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine

Travail du Laboratoire de Bactériologie (Professeur Lisbonne)

Examinateurs de la Thèse	LISBONNE, professeur, *Président*	*Assesseurs*
	JEANBRAU, professeur	
	TERRACOL, professeur	
	CARRÈRE, agrégé	

BÉZIERS
IMPRIMERIE DU SUD
M. IZARD, Administrateur Judiciaire
9, Rue Berlioz, 9 - Téléphone 7.80
1938

Les Méthodes de Culture
DU BACILLE DE KOCH

appliquées

ou Diagnostic de la Tuberculose

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DE MÉDECINE

N° 23

LES METHODES DE CULTURE
DU BACILLE DE KOCH
appliquées au Diagnostic de la Tuberculose

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 12 Mars 1938

PAR

René DELMAS

Né le 10 Janvier 1912, à Montpellier (Hérault)

Pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine

Travail du Laboratoire de Bactériologie (Professeur Lisbonne)

Examinateurs de la Thèse

LISBONNE, professeur, *Président*
JEANBRAU, professeur
TERRACOL, professeur
CARRÈRE, agrégé

Assesseurs

BÉZIERS
IMPRIMERIE DU SUD
M. IZARD, Administrateur Judiciaire
9, Rue Berlioz, 9 - Téléphone 7.80
1938

Personnel de la Faculté

PROFESSEURS

Anatomie	MM	J. Delmas
Histologie		Turchini
Physiologie		Hedon
Chimie biologique et médicale		Cristol
Physique médicale		Pech
Anatomie pathologique		Grynfeltt
Microbiologie		Lisbonne
Pathologie et thérapeutique générales		Pages
Thérapeutique et matière médicale		Boudet
Hydrologie thérapeutique et climatologie		Puech
Hygiène		Carriéu
Médecine légale et médecine sociale		Vidal
Pathologie médicale et clinique propédeutique		Boulet
Clinique médicale		Giraud Rimbaud
Clinique chirurgicale		Massabuau, assess Riche
Clinique obstétricale		P. Delmas
Clinique des maladies mentales et nerveuses		Euzière, doyen
Clinique des maladies des enfants, et hygiène du premier âge		Leenhardt
Clnique de dermatosyphiligraphie		Margarot
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie		Etienne
Clinique des maladies des voies urinaires		Jeanbrau
Clinique gynécologique		Lapeyre
Clinique ophtalmologique		N...
Clinique d'oto-rhino-laryngologie		Terracol
Radiologie (Ch. de c.)		Lamarque
Anatomie (Chargé de cours)		Laux
Histologie (Chargé de cours)		Granel

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

HONORIAT

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Rodet, Tedenat, Vallois, Forgue,
Estor, Bertin-Sans, Cabannes, Galavielle, Vires, Posc. Villard

CHARGES DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Pathologie expérimentale	MM. Guibal
Clinique propedeutique chirurgicale	Aimes
Médecine opératoire	Soubeiran, ag. libre
Accouchements	Coll de Carrera
Clinique phtisiologique	Boudet
Pathologie médicale et Clinique propédeutique médicale	Baumel
Clinique propédeutique médicale	P. Rimbaud
Clinique des maladies contagieuses	Janbon
Stomatologie	Dr Waton
Pathologie externe	Mourgue-Molines
Ophtalmologie	Déjean

AGREGÉS EN EXERCICE

Chirurgie	MM. Aimes Mourgue-Molines Guibal Roux
Médecine	MM. Janbon Baumel Rimbaud
Bactériologie	Carrère
Ophtalmologie	Déjean

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

LISBONNE, professeur, *Président*
JEANBRAU, professeur
TERRACOL, professeur
CARRÈRE, agrégé

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555411_0009

À Celles et à Ceux qui ont contribué à la formation de mon esprit et de mon cœur.

La haute valeur scientifique et morale de Monsieur le Professeur CASTAIGNE a été pour moi le plus bel exemple et à décidé de mon orientation médicale.

Il a été, et il demeure, le meilleur de mes conseillers.

Qu'il me permette de lui témoigner ici ma filiale affection.

AVANT PROPOS

Avec ce travail se terminent les années d'études au cours desquelles nous avons contracté des dettes de reconnaissance envers les Maîtres dont nous avons été l'élève tant à la Faculté qu'aux Hôpitaux. Le moment est venu de leur exprimer nos sentiments de gratitude.

Monsieur le Professeur Lisbonne a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et faire de nous un de ses collaborateurs. Il nous fait aujourd'hui le grand honneur de présider cette thèse. Nous le prions de bien vouloir trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre fidèle attachement.

Nous avons été l'externe de Monsieur le Professeur Jeanbrau, il nous a reçu avec bonté dans son service et soutenu chaque jour de ses conseils et de ses encouragements. Nous ne saurions jamais lui dire assez l'attachement et la gratitude que nous avons pour lui.

Monsieur le Professeur Terracol dans le service duquel nous avons été externe a bien voulu s'intéresser à nous avec sa bienveillance coutumière. Nous lui en somme particulièrement reconnaissant.

Monsieur le Professeur agrégé Carrère nous a toujours heu-

reusement conseillé et nous ne saurions oublier ses directives amicales.

Notre reconnaissance respectueuse va vers les Maîtres dont nous avons eu l'honneur d'être l'externe Messieurs les Professeurs Leenhardt et Villard.

Enfin, nous ne voudrions oublier aucun de ceux qui nous ont conseillé, Mademoiselle Labraque Bordenave dans le Laboratoire de Bactériologie. Monsieur le Docteur Devèze à l'Institut Bouisson-Bertrand.

Monsieur le Docteur Nègre a eu la bonté de nous accueillir et de nous guider dans la Maison de Pasteur. Nous ne pouvons terminer ce travail sans lui témoigner toute notre reconnaissance.

INTRODUCTION

Le problème de la culture du bacille de Koch n'est pas récent, nous serions presque tentés de dire qu'il est résolu depuis bien longtemps puisque deux ans à peine après la découverte du germe, Robert Koch obtenait les premières colonies et dans un délai de temps qui, comparé aux résultats obtenus de nos jours, paraît remarquablement rapide. Cependant, il ne pouvait être question d'en tirer une méthode pratique pour le diagnostic de la maladie.

La culture du bacille de Koch, à partir des produits pathologiques, surtout s'ils sont secondairement infectés, est en effet hérissée de difficultés. Les bacilles ne se développent pas sur les milieux usuels ; ils se présentent rarement seuls, presque toujours les produits pathologiques qui les contiennent sont souillés par des germes d'infection secondaire dont le développement plus rapide envahit les milieux. Aussi pendant longtemps, le diagnostic bactériologique de la tuberculose a fait appel aux caractères morphologiques, assez particuliers, du bacille de Koch ; et lorsque cet examen ne suffisait pas à mettre ce germe en évidence, le cobaye jouant le rôle

de véritable milieu vivant aussi bien électif que sélectif apportait son concours précieux. Plus tard, les méthodes sérologiques sont venues compléter nos moyens d'investigations, mais sans apporter dans le domaine de la tuberculose les renseignements sensibles et spécifiques que la clinique demande au laboratoire.

La lacune laissée par la culture des bacilles de Koch à partir des produits pathologiques secondairement infectés est aujourd'hui comblée. Les milieux à l'œuf, l'isolement du bacille de Koch à l'acide sulfurique suivi de neutralisation à la soude, ont rendu la culture du germe de la tuberculose facile et sûre. Ce procédé élégant présente de nombreux avantages, la sensibilité et la rapidité des résultats ne sont pas les moindres, sa précision permet de distinguer entre elles les souches humaines, bovines et aviaires. La possibilité de posséder le germe vivant en colonies isolées nous donne ce signe scientifique de certitude qui permet d'apporter un diagnostic à l'abri de toute critique et de toute cause d'erreur.

Nous nous sommes efforcés dans ce travail de situer la méthode de culture parmi les autres méthodes de diagnostic bactériologique de la tuberculose. Après en avoir exposé la technique et précisé ses bases expérimentales, nous apportons parmi les résultats personnels que nous avons obtenus, ceux qui nous paraissent constituer une intéressante illustration de la méthode.

Puissions-nous, dans notre très modeste sphère, contribuer à la vulgarisation de la culture du bacille de Koch qui sorti aujourd'hui du domaine des laboratoires de recherches, mérite de s'imposer dans la pratique courante.

La culture du bacille de Koch, qui commence à connaître dans les laboratoires de diagnostic une grande faveur, doit son succès et sa diffusion rapide, non seulement à sa simplicité et à sa sensibilité, mais à l'intérêt pratique de son emploi. Elle vient occuper dans les méthodes de diagnostic de la tuberculose une place importante qui était restée vide jusqu'alors. Elle est la satisfaction d'un besoin, d'une nécessité.

Si nous passons en revue les diverses méthodes proposées et employées jusqu'à aujourd'hui, aucune ne présente ni la même valeur ni les mêmes avantages. Pour ne point apporter ici d'affirmation sans qu'un examen des faits, rapides sans doute, ne vienne en apporter la justification, nous allons les exposer un à un, nous attachant à montrer pour chacun d'eux les raisons pour lesquelles ils ne nous apportent pas le signe scientifique de certitude que nous trouvons dans l'ensemencement des produits pathologiques, d'où la supériorité de cette méthode.

Pour exposer ces méthodes, nous suivrons autant que possible un ordre raisonné, nous laissant guider pas à pas par les diverses étapes du diagnostic bactériologique en général, montrant pour chacune d'entre elles, son aspect particulier vu sous l'angle de l'infection bacillaire.

Le schéma de ces diverses étapes se résume de la façon suivante :

Recherche du germe, des caractères morphologiques :
isolement des cultures,
recherche des caractères biochimiques,
recherche de la virulence.

Recherche des témoins :

in vitro,

in vivo.

Examens secondaires et accessoires.

Première Partie

Les diverses méthodes de diagnostic bactériologique de la tuberculose

Leur insuffisance

Chapitre premier. -- **Recherge du germe**
Examen direct.
Homogénisation.
Inoculation.

Chapitre II. -- **Recherche des anticorps in vitro.**
Recherche des anticorps **in vivo.**

Chapitre III. -- **Examens accessoires**

CHAPITRE PREMIER

Recherche du germe

EXAMEN DIRECT APRES COLORATION

Le premier de tous les procédés, le plus ancien et aussi le plus généralement employé est l'examen direct après coloration. Parmi les innombrables méthodes de coloration, celle de Ziehl-Neelsen a prévalu. Elle est basée sur les propriétés d'acido-alcoolo résistance du bacille de Koch. Après étalement et fixation sur une lame du produit pathologique, coloration à chaud par la fuschine phéniquée pendant cinq minutes, on lave à l'eau et on décolore dans l'acide sulfurique au quart ou l'acide nitrique au tiers pendant deux minutes, puis à l'alcool pendant cinq minutes encore, après quoi le fond de la préparation est recoloré rapidement au bleu de méthylène. La préparation est alors examinée au microscope.

Que voit-on alors? Ou des éléments acido-alcoolo-résistants colorés en rouge sur fond bleu ou malgré un examen prolongé de la préparation, ces éléments ne sont pas rencontrés. Pouvons-nous affirmer, dans le premier cas, qu'il s'agit de bacilles de Koch, dans le

deuxième l'absence de bacilles de Koch? Ce serait aller bien vite et se contenter d'un examen très insuffisant. Tout ce qui est acido alcoolo-résistant n'est pas bacille de Koch.

L'absence de bacilles de Koch après un examen direct ne traduit pas l'absence des bacilles de Koch dans un produit pathologique.

S'il y a présence d'éléments acido-alcoolo-résistants, une première remarque s'impose : s'agit-il vraiment de bacilles acido-alcoolo-résistants? Eliminons d'abord tous les artefacts de préparation, débris de colorant, d'hématies, de noyaux cellulaires, qui peuvent rester colorés en rouge, mais dont la forme ne peut pas prêter à confusion. Par contre, peuvent prêter à confusion, tous les germes pseudos acido-alcoolo-résistants et ils sont nombreux. Qu'ils soient acido-résistants seulement ou seulement alcoolo-résistants ou insuffisamment décolorés par l'alcool ou l'acide, leur présence sur la lame est un gros écueil. Ecueil moins rare qu'on ne pourrait le croire, si l'on tient compte de toutes les nombreuses espèces qui ont été décrites. Il s'en trouve pour ainsi dire partout, non seulement dans l'air, les poussières, mais à la surface du corps et dans les produits pathologiques eux-mêmes. On ne saurait par conséquent trop recommander de pratiquer la coloration de Ziehl suivant une technique rigoureuse, la décoloration à l'acide et à l'alcool ayant été prolongée pendant deux minutes pour affirmer que l'on se trouve bien en présence d'éléments acido-alcoolo-résistants.

Cette précaution ne représente pourtant pas une garantie absolue. L'examen direct porte en lui toutes les insuffisances du diagnostic bactériologique basées sur des caractères morphologiques. Sans doute, lorsque les signes cliniques sont nets, lorsque la clinique ne demande au laboratoire qu'une confirmation supplémentaire, on peut, sans trop s'avancer, considérer comme bacille de Koch un bacille acido-alcoolo-résistant ; mais ce n'est pas là une méthode scientifique,

D'autres germes que le bacille de Koch sont des acido-alcoolo-résistants vrais. Les uns sont pathogènes, les autres sont saprophytes, leur présence sous le microscope est toujours possible, on doit les connaître et s'en méfier. Il n'est pas d'expérimentateur qui, après avoir vu les bacilles acido-alcoolo-résistants que l'on rencontre assez fréquemment dans les anti-giscleurs de robinets, osera prendre la responsabilité d'affirmer la présence de bacilles de Koch sur un simple examen direct.

Sans en faire une étude, donnons ici une brève nomenclature de ces germes où du moins des principaux.

I. — Les bacilles acido-alcoolo-résistants vrais, trouvés chez l'homme et pathogènes sont:

les bacilles tuberculeux,
le bacille de la lèpre de Hansen,
le bacille de Vérugua du Pérou.

II. — Les bacilles non virulents ou probablement:

a) *Chez l'homme sain:*

les bacilles du mucus nasal de Karlinski,
du cérumen de Gottstein,
de la peau de Lustgarten,
du smégma d'Alvarez et Tavel,
de Rabinowitsch.

b) *Chez l'homme malade:*

dans la gangrène pulmonaire,
dans les autres affections pulmonaires,
dans les affections oculaires (Ginsberg),
affections urogénitales,
dans les fèces des typhiques.

III. — Chez les animaux :

bacilles de l'entérite hypertrophiante des bovidés de Moeller,
de la pseudo-pommelière des vaches,
du pis des baches et du smegma,
du lait et du beurre de Pétri, Rabinowitsch, de Corn, de Coggi, de Tobbler,
des œuf.

IV. — Bacilles de la nature, de la fléole, des eaux d'égoûts, des instruments à vent, de la peau des cobayes, etc., etc...

Les bacilles para-tuberculeux ne sont pas les seuls responsables des causes d'erreurs, les cadavres de bacilles de Koch provenant de fautes dans les manipulations, en particulier l'emploi de lames ayant déjà servi et qu'il est si difficile de nettoyer parfaitement doit être totalement proscrit.

En plus des causes d'erreurs, l'examen direct est passible d'autres critiques. Cet examen fournit des résultats pauvres. Le bacille de Koch est rarement un germe que l'on voit pulluler dans les produits pathologiques. Combien de bacillaires émettent chaque jour une expectoration de volume abondant, expectoration dans laquelle il est quelquefois impossible de mettre en évidence l'élément causal.

En face d'un examen direct négatif, le bactériologiste est-il autorisé à affirmer l'absence de bacilles de Koch ? Certainement pas. Aussi, la réponse du laboratoire ne s'exprime jamais par la phrase : « Absence de bacilles de Koch », mais : « Il n'a pas été vu de bacilles de Koch », ou plus simplement : « Examen négatif ».

De bonne heure, divers procédés ont été imaginés pour pallier à cette insuffisance. Laissons de côté, pour

l'instant, toutes les méthodes physiques ou chimiques destinées à mettre en évidence, dans les produits pathologiques, des témoins de l'infection bacillaire, pour nous attacher aux méthodes destinées à rechercher le germe lui-même, méthodes faisant appel à l'enrichissement du produit examiné ou à la multiplication du germe. Ce sont : l'homogénéisation et l'innoculation au cobaye.

L'homogénéisation

L'homogénéisation a pour but d'obtenir la séparation des bacilles d'avec les matières (globules de pus, déchets cellulaires, etc...), au sein desquelles ils se trouvent disséminés et souvent enrobés.

Les divers procédés mis en œuvre, et ils sont nombreux, consistent à fluidifier le milieu sous l'action d'agents physiques ou chimiques, après quoi les bacilles sont rassemblés par centrifugation ou décantation. Il n'entre pas dans cette étude de décrire plus précisément la méthode. Sa valeur et ses inconvénients sont, par contre, intéressants à préciser.

L'homogénéisation présente-t-elle un progrès considérable sur un examen direct bien fait ? Leurs auteurs ont publié des statistiques qui leur ont permis de récupérer bien des cas positifs après un examen direct négatif. Cependant, nombreux sont les laboratoires où la recherche du bacille de Koch pratiquée par des observateurs attentifs et patients, pendant au moins vingt minutes, s'est montrée presque aussi sensible que l'homogénéisation.

D'autre part, l'homogénéisation fait appel à de nombreuses manipulations et c'est toujours là la porte d'entrée possible de nombreux acido-alcoolo-résistants non tuberculeux, ou l'apport de bacilles de Koch morts dont il est si difficile de débarrasser le fond des godets à centrifugation.

Enfin, les résultats demeurent encore trop souvent insuffisants.

Inoculation

Comment se situe ce procédé dans les méthodes de diagnostic bactériologique de la tuberculose? Dans quel but fait-on appel à lui?

D'une façon générale, l'inoculation d'un germe à des animaux a pour but de créer chez ceux-ci une infection expérimentale, véritable matérialisation du caractère de virulence. Il faut bien reconnaître que c'est là rarement le but que l'on se propose en inoculant un cobaye avec des produits pathologiques suspects de tuberculose. Nous disons bien, en effet, produits suspects et non produits tuberculeux; on veut donc passer d'une suspicion à une certitude. Il faut reconnaître que le cobaye accepte remarquablement le rôle que l'on attend de lui. Animal susceptible de subir l'infection tuberculeuse, il va se comporter vis-à-vis des bacilles inoculés comme un véritable milieu de culture vivant où les bacilles vont marquer leur présence par des lésions caractéristiques, où ils vont se multiplier, ce qui rend leur mise en évidence singulièrement facilitée.

Le rôle du cobaye est plus remarquable encore, milieu vivant, disions-nous; milieu sélectif, faut-il encore préciser, puisque son organisme se chargera d'éliminer les germes secondaires et de réaliser un véritable isolement. Le cobaye précise, enfin, le caractère de virulence.

On conviendra qu'un tel procédé présente bien des avantages.

Il présente aussi des inconvénients: un élevage d'animaux est une lourde charge pour un laboratoire. Il faut tenir compte de la possibilité de mort intercurente de l'animal ou de sa contamination.

Nous reviendrons d'ailleurs sur le sujet de l'inocula-

tion pour le préciser et le comparer à la culture, lorsque nous étudierons ce chapitre.

Poursuivons les étapes du diagnostic bactériologique en général, nous avons vu la recherche du germe (caractères morphologiques) et la recherche de la virulence, nous avons sauté au passage la recherche des propriétés biochimiques qui n'est pas encore du domaine pratique pour le diagnostic. Nous en arrivons à la recherche des témoins.

CHAPITRE II

Recherche des anticorps **in vitro**
Recherche des anticorps **in vivo**

Recherche des anticorps **in vitro**

Agglutinines

Les premiers travaux sur l'agglutination, par Arloing, remontent à 1888 et sont faits à partir de culture homogène.

Le séro-diagnostic d'Arloing et Courmont se recherche aux dilutions de 1/20 et 1/10. L'examen macroscopique ne suffit pas, il faut aussi un examen microscopique. La réaction n'est pas rigoureusement spécifique, elle peut être positive au cours de la pneumonie, la fièvre thyphoïde, l'érysipèle, l'ictère, la grippe, et redevient négative après la convalescence. Elle peut être positive chez certains individus cliniquement non tuberculeux, et négative chez les tuberculeux gravement atteints. Les statistiques de Arloing et Courmont donnent 87 % de réactions positives chez les bacillaires avérés, 34 % chez

les suspects, 26 % chez les individus supposés sains, 100 % dans les tuberculoses chirurgicales. D'autres auteurs apportent une proportion beaucoup plus forte de résultats positifs avec des sujets sains; il est probable que ces réactions positives traduisent des tuberculoses latentes. Le résultat n'aurait de valeur clinique que lorsqu'il est négatif. Du point de vue pronostic, de fortes oscillations du titre agglutinatif seraient en faveur d'un processus actif. Pour Courmont, le taux d'agglutination s'élèverait chez les tuberculeux qui guérissent.

Les agglutinines existent dans d'autres humeurs que le sérum: épanchements pleuraux, liquides d'ascite, d'hydrathroses, d'hydrocèles. L'agglutination ne permet pas de différencier les diverses races de bacilles.

Précipitines, précipito-diagnostics

Calmette et Massol, en 1909 mettent en présence des sérosités suspectes avec du sérum de bovidés traités en vue de leur immunisation. Les résultats sont trop irréguliers pour que la réaction puisse être pratiquement utilisée. Positive dans la méningite tuberculeuse, dans la syphilis cérébrale, la fièvre typhoïde, par contre une réaction négative permettrait d'exclure la suspicion de tuberculose. Bezançon et de Serbonnes attribuent à la réaction, quand elle est forte, une valeur pronostique favorable, car elle diminue ou disparaît dans les cas graves.

Réaction de floculation de Meinicke

Elle utilise trois antigènes différents (alcoolique fort, faible et aqueux); il y a floculation en mettant en contact du sérum actif et de l'extrait standard additionné d'antigène tuberculeux. La floculation apparaît sous forme de petits flocons qui se sédimentent; il existe une micro et une macro-réaction.

Le degré de spécificité est élevé. 100 % de résultats

négatifs avec des sérums normaux, 92 % de résultats négatifs avec des sérums de diverses maladies, 89 % de résultats positifs avec les sérums tuberculeux.

Réaction d'opacification de Dujaric de la Rivière et Gallerand

Ces auteurs ont indiqué une méthode d'opacification de sérum tuberculeux en présence d'un mélange antigène gomme-gutte; sa spécificité est très inférieure à celle de la réaction de fixation et à celle de la réaction de Vernes à la résorcine.

Sensibilisatrices

Réaction de déviation du complément

L'application à la tuberculose des travaux de Bordet-Gengou, précéda celle que Wassermann en fit à la syphilis. De nombreux antigènes ont été proposés : antigène B2 de Calmette et Massol, antigène méthylique de Boquet et Nègre, antigènes de Besredka, de Pétroff, de Wassermann, etc... L'emploi presque exclusif, à l'heure actuelle de l'antigène de Besredka fait désigner le plus souvent cette réaction par le nom de cet auteur. La technique utilisée est celle de Calmette et Massol qui permet le dosage des anticorps et donne une réaction pour des doses minimes d'anticorps.

Tour à tour attaquée et défendue, la valeur de cette réaction est loin d'être absolue. Elle n'est, en définitive, qu'un renseignement, un symptôme à ajouter aux autres. Généralement négative en cas de non tuberculose clinique, elle peut cependant donner des résultats positifs au cours de la syphilis, du paludisme en activité, de l'encéphalite léthargique. Son caractère positif est, par contre, assez constant dans la tuberculose pulmonaire confirmée. Cependant, une tuberculose récente ou trop

grave, peut donner une réaction négative par manque de production d'anticorps. Les autres formes de tuberculose donnent des résultats irréguliers et à pourcentage faible.

Opsonines

La détermination de l'index opsonique nécessite des manipulations délicates. La méthode a pour but de mettre en évidence l'action stimulante des opsonines du sérum du malade sur l'action phagocytaire par rapport aux bacilles de Koch, de leucocytes observés *in vitro*. Les renseignements fournis n'ont qu'une faible valeur du point de vue diagnostic, cette méthode ne peut être utilisée avec profit que pour le pronostic.

Mais il faut alors faire des examens répétés et dresser une courbe de variations de cet indice. Une courbe sans oscillations traduit un indice stable et quel qu'en soit le chiffre, un bon pronostic; un indice variable avec des hauts et des bas est, au contraire, d'un mauvais pronostic.

Phénomènes de floculation

Séro-réaction de Vernes à la résorcine

Si l'on distribue, dans une série de petits tubes, du sérum humain normal, puis un réactif capable de provoquer la floculation dans le mélange, l'un à dose fixe et l'autre à dose régulièrement croissante de gauche à droite, la floculation augmente et diminue tour à tour en dessinant une courbe ondulée (sinusoïde), dont le tracé varie suivant le réactif employé. Le phénomène s'obtient en présence d'un antigène lipoïdique (péréthynol) pour la syphilis, avec la résorcine pour la tuberculose.

Les résultats se lisent au photomètre de Vernes. Si le sérum observé est parfaitement clair, le chiffre 30 et au-dessus indique l'existence de la tuberculose. Seuls,

les sérums de malades porteurs d'un chancre en voie d'apparition peuvent donner le même résultat. De 0 à 15 on est en présence d'un sérum normal, sauf de rares exceptions; de 15 à 30, il y a probabilité croissante. On a vu, dans cette réaction, la traduction d'une altération du sang en rapport direct avec le degré et l'évolution de l'infection bacillaire. L'intensité de la réaction a été mise en rapport avec la gravité de l'affection. Les résultats de cette réaction, confrontés avec ceux obtenus par la réaction de fixation du complément lorsqu'on utilise des antigènes sensibles tels que ceux de Boquet et Nègre ou de Besredka sont sensiblement les mêmes. La réaction de Vernes paraît présenter une plus grande sensibilité dans les formes pulmonaires évolutives, la fixation du complément lui est supérieure dans les formes inactives.

Recherche des anticorps **in vivo**

Diagnostic par les réactions tuberculiniques

Il repose sur les propriétés biologiques de la tuberculine. Celle-ci, inactive chez les sujets neufs, c'est-à-dire n'ayant subi aucune infection par le bacille de Koch, provoque diverses réactions chez le sujet qui a subi une infection bacillaire.

Les réactions sont de trois ordres: générales, focales et locales. De nombreuses techniques ont été proposées. Les principales sont: la sous-cuti-réaction, la cuti-réaction de Von Pirket, l'intra-dermo-réaction de Mantoux, l'ophtalmo-réaction de Calmette et Wolff-Eisner. Ces méthodes sont susceptibles de fournir à la clinique, les renseignements les plus précieux, mais ces renseignements n'ont pas un caractère absolu et définitif. Ils fournissent la preuve irrécusable de la pénétration récente ou ancienne du bacille de Koch en un point quelconque de l'organisme. Cette réactivité à la tuberculine

porte le nom d'allergie. Celle-ci s'établit lentement, mais elle est facile à acquérir et d'une stabilité remarquable. Sa sensibilité fait sa force et sa faiblesse. On peut lui reprocher de ne pas distinguer les bacilloses pathologiques des bacilloses physiologiques, le sujet sain du sujet malade. Pour qu'elle puisse acquérir la valeur d'un symptôme, il faudrait l'envisager à une phase de l'existence où elle est exceptionnelle, c'est-à-dire chez l'enfant. Inversement, la réaction à la tuberculine étant la règle chez l'adulte et son absence l'exception, devrait pouvoir, semble-t-il, quand elle est négative, permettre d'éliminer la tuberculose. La réalité n'est pas aussi simple, il faut compter avec les allergies précoces de l'enfant et avec certaines influences étrangènes à la tuberculose qui ont pour effet de supprimer ou d'annuler temporairement l'état allergique.

Ces considérations peuvent se résumer de la façon suivante :

A) Réaction négative :

1. sujet vierge de toute infection bacillaire ;

2. phases pré-allergiques ;

3. sujet désensibilisé par une influence pathologique intercurrente : affections anergisantes, grippes, rougeoles, coqueluches, typhoïdes, pneumonies (toutes les grandes causes de déchéance organique), la grossesse, les affections hépatiques en général, certaines tuberculoses osseuses et la tuberculose elle-même quand elle devient consomptive et cachectisante.

B) La réaction à la tuberculine est positive :

1. Chez l'enfant au-dessous de 3 ans, sa valeur est alors presque absolue ;

2. Chez l'enfant au-dessus de 3 ans, elle ne donne que des probabilités;

3. Chez l'adulte: elle n'a guère de signification; elle permet d'apprécier la résistance de l'organisme et tire de ce fait une valeur pronostique certaine.

CHAPITRE III

Examens secondaires et accessoires

Cyto-diagnostic

Généralement réservé à l'étude des épanchements pleurétiques. La prédominance de lymphocytes (petits mono-nucléaires à gros noyaux basophiles) est si constante, qu'elle permet d'affirmer la nature tuberculeuse de l'épanchement. Il en est de même pour les épanchements des autres séreuses et pour le liquide céphalo-rachidien, lorsque les lymphocytes y sont en proportions élevées.

Le sang et ses éléments figurés

L'étude des modifications globulaires n'offre aucun intérêt. Les nombreux travaux faits à ce sujet n'ont donné que des résultats insuffisants ou contradictoires. Ni le nombre des hématies, ni la valeur globulaire, ni la résistance globulaire ne sauraient être retenus. La formule sanguine, par contre, nous donne des résultats

plus intéressants. On a pu décrire des formules de résistance avec une leucocytose modérée, caractérisée par une lymphocytose assez prononcée et une légère éosinophilie. Les formules de défenses : hyperleucocytose avec polynucléose abondante ou mononucléose avec diminution constante des éosinophiles et lymphocytes. Dans les formes caséeuses rares, forte hyperleucocytose avec 90 % de polynucléaires, c'est la formule de déchéance. Pour certains auteurs, la neutrophilie entrainerait un pronostic grave. L'éosinophilie, par contre, serait favorable.

Réaction de sédimentation des globules rouges

Diverses techniques ont été proposées. N'a pas de valeur diagnostique, car elle n'est pas spécifique ; elle serait proportionnelle à l'activité du processus tuberculeux.

Elle aurait un intérêt pronostique.

Albumino-réaction

C'est la recherche et le dosage de l'albumine dans les crachats tuberculeux. Diverses techniques font appel à la précipitation de l'albumine par le ferrocyanure de potassium en solution aqueuse saturée où par l'acide nitrique, après une précipitation préalable de la mucine et de nucléo-albuminoïde par l'acide acétique. La réaction, loin d'être spécifique, est positive au cours des infections aiguës du poumon (pneumonie, bronchopneumonie, congestion pulmonaire, congestion passive des cardiopathes, œdèmes des brightiques) ; elle est négative dans la tuberculose miliaire où les granulations encloses dans le parenchyme pulmonaire ne donne pas lieu à la formation d'exsudats. Cette réaction est pourtant intéressante, car l'albumine disparait des crachats lorsque les foyers deviennent inactifs. Elle est positive momentanément chez les malades qui réagissent à une

injection sous-cutanée de tuberculine. La prédominance de sérine est d'un pronostic défavorable.

Après l'énumération de ces nombreuses méthodes, la conclusion ne peut traduire que des approximations. Insuffisance d'un côté, imprécision de l'autre, nulle part, exception faite pour la méthode d'inoculation, nous n'avons trouvé la réponse sûre indiscutable que la clinique est en droit de demander et d'attendre du laboratoire.

Ce n'est pas que les chercheurs aient négligé de prendre le problème sous tous ses aspects et qu'ils n'aient pas cherché toutes les solutions possibles. Mais ce qui était valable pour d'autres germes perdait de sa valeur pour le bacille de Koch et l'on doit reconnaître que ce germe, si particulier, ne se prête pas suffisamment à l'application des méthodes générales.

In vivo ou *in vitro*, son développement, son comportement, suivent un mécanisme particulier, il semble que sa carapace de cire, en fait un être à part, un original, vivant en marque de son monde et de ses coutumes.

Deuxième Partie

La Culture

Chapitre premier. -- **Les milieux de culture**
Historique.
Constitution.
Valeur comparée

Chapitre II. -- **La méthode**
Etude expérimentale de l'isolement par l'acide sulfurique.
Technique selon les produits pathologiques.

Chapitre III -- **Les résultats**
Délai d'apparition.
La microculture.
Les colonies.
Valeur des résultats.

Chapitre IV. -- **L'Innoculation**
Valeur comparée avec culture.

CHAPITRE PREMIER

Les milieux de culture

Après tant de méthodes de diagnostic de la tuberculose, nous en arrivons à la dernière en date : la culture. Nous allons nous efforcer d'en montrer les avantages : simplicité, sûreté et aussi les inconvénients, ou du moins, nous préciserons les précautions indispensables pour lui donner toute sa valeur.

Nous examinerons successivement les divers milieux de culture, leur composition et leur valeur comparée. La méthode d'ensemencement et les techniques destinées à isoler le bacille de Koch des autres germes présents dans les produits pathologiques. Nous indiquerons les particularités d'isolement suivant le produit pathologique à ensemencer. Pour les résultats de la culture, nous étudierons successivement les délais d'apparition des colonies et leur valeur, les caractères de culture des diverses races de bacilles de Koch, le diagnostic précoce par la recherche des micro-cultures.

Nous discuterons enfin la valeur des résultats et les causes d'erreur possibles. Nous comparerons enfin la

culture avec les méthodes d'inoculation aux cobayes qui, jusqu'à maintenant, étaient les seules à présenter un caractère de sûreté indiscutable

Historique

Bien que son application au diagnostic bactériologique de la tuberculose soit de date récente, le problème de la culture du bacille de Koch s'est posé dès la découverte du germe par Robert Koch, en 1882. Les premières tentatives furent vouées à l'échec, mais très rapidement (deux ans après, en 1884) les premières colonies étaient obtenues sur sérum de mouton ou de bœuf stérilisé ou coagulé. Robert Koch avait ensemencé des tubercules ramollis et écrasés. Les colonies avaient mis près de quinze jours à apparaître, les repiquages sur les milieux usuels n'avaient pas donné de résultats.

Pourtant, peu après, en 1887, Nocard et Roux faisaient faire des progrès décisifs à la question, en introduisant dans les milieux de culture (bouillon gélosé ou sérum) de la glycérine en proportions convenables, 5 à 8 %.

En 1888, Pawlowsky introduit la pomme de terre glycérinée.

En 1889, Bezançon et Griffon préparent un milieu liquide composé d'eau peptonée glycérinée à 5 %, gélosé à 3 % et additionné de sang de lapin.

L'œuf fait son apparition dans les milieux en 1896, il y est introduit par Copaldi.

Il faut cependant attendre 1902 pour que Dorset prépare le milieu à l'œuf d'utilisation pratique.

L'utilisation de ces milieux n'a été pratiquement réalisable que le jour où l'on s'est attaché à éliminer les microbes d'association secondaire.

Spengler, en 1900, s'adresse aux vapeurs de formol qu'il faisait dégager dans une boîte de Pétri où des cra-

chats avaient été étalés en couche mince, le contact était prolongé pendant deux heures.

En 1904, Piatkovsky obtient les mêmes résultats en émulsionnant quelques gouttes de formol, le produit pathologique et du bouillon.

Avec Uhlenhuth (1908-1909), on abandonne le formol pour faire appel à l'antiformine à raison de trois parties de crachats pour une d'antiformine à 35 % et contact une heure. Malgré bien des modifications successives, c'est encore cette méthode qui est le plus employée dans les pays anglo-saxons.

Une méthode toute autre fait son apparition en 1915. Pétrof isole le bacille de Koch des produits infectés secondairement par l'action de la soude à 4 % ; il démontre que le contact prolongé un temps suffisant détruit les germes banaux sans altérer la vitalité du bacille de Koch. De plus, il perfectionne le milieu de Lubenau en ajoutant à ce milieu de culture, un colorant antiseptique, le violet de gentiane, dans le but de détruire les germes d'association secondaire et de permettre l'ensemencemnt direct des produits légèrement contaminés.

Dès ce moment, on a vu apparaître les premières cultures positives à partir de produits tuberculeux qui ne présentaient pas de bacilles à l'examen direct. Limousin, en France, contribue à répandre la méthode.

Deux Américains, Corper et Uyei, en remplaçant le violet de gentiane par le cristal violet, rendent élective la pomme de terre elle-même. D'autres violets sont également essayés et leurs résultats semblent à peu de chose près, équivalents.

Pétragnani, de 1923 à 1926, met au point son milieu composé d'œufs, de lait de peptone et de vert malachite qui, après divers essais destinés à comparer entre elles diverses substances colorantes, lui paraît, sans nuire au développement du bacille de Koch, avoir l'action la plus marquée sur les moisissures et les germes de la flore

secondaire. De plus, il utilise le contact de la soude à 4 % pendant une demi-heure avec les produits à ensemencer; là encore, il apporte un nouveau perfectionnement : la neutralisation par l'acide chlorhydrique à 10 % en présence de tournesol du produit ainsi traité. La supériorité de ce milieu sur celui de Pétroff est confirmé par de nombreux auteurs.

Malheureusement, ces recherches demeuraient limitées au domaine des laboratoires spécialisés. Jusqu'en 1924, la culture du bacille de Koch à partir de produits secondairement infectés paraissait trop difficile pour pouvoir entrer dans la pratique courante.

Après un premier essai d'emploi de l'acide sulfurique à 10 %, en 1922. Loewenstein, et son élève, Sumyjoski, apportent une impulsion nouvelle au problème de la culture. L'élimination des microbes d'association ou des saprophytes banaux se trouvaient rapidement réalisables. A un volume de crachat, on ajoutait 20 % d'une solution d'acide sulfurique à 40 %. Le culot de centrifugation lavé à l'eau distillée était ensemencé sur pomme de terre glycérinée et plus tard, sur le milieu créé par l'auteur, à base d'œufs, d'asparagine et de rouge congo ou de vert malachite.

Cette méthode reprise, systématiquement étudiée et mise au point grâce aux travaux de Pulcher, de Hohn surtout, qui a apporté dans la concentration d'acide et au temps de contact nécessaire toute la précision voulue, est devenu aujourd'hui un procédé pratique et sûr.

Saenz et Costil, dans une dernière étape, améliorent le milieu de Pétragnani; ils établissent très exactement les bases expérimentales de l'action de l'acide sulfurique, suivie de neutralisation à la soude en présence d'un indicateur coloré; ils obtiennent alors des résultats d'une précision remarquable et dans un minimum de temps. Nous allons exposer cette méthode avec tous les détails nécessaires, nous attachant à montrer ses avantages et les raisons pour lesquelles son emploi doit se généraliser dans les laboratoires de diagnostic au même titre que la culture des autres germes.

Principaux milieux de culture

Milieu de Dorset

Des œufs de poules soigneusement lavés et brossés dans l'eau bouillie sont immergés pendant 15 minutes dans une solution phéniquée à 5 %. On les saisit entre deux feuillets de papier buvard stérile, on flambe leurs deux pôles et avec une pince pointue flambée, on pratique une ouverture sur chacun de ces pôles (au-dessus de la flamme veilleuse d'un bec Bunsen). Au moyen d'un tube de caoutchouc stérile portant un filtre à coton stérilisé, on souffle par l'ouverture supérieure correspondant à la chambre à air, de telle sorte que le contenu de l'œuf tombe de l'ouverture inférieure dans un matras d'Erlenmeyer stérile et préalablement taré. On introduit ensuite, dans le matras, une quantité d'eau stérile correspondant à 10 % du poids d'œuf, et on agite pour assurer le mélange homogène du jaune, du blanc, et de l'eau, sans faire de bulles d'air. On jette le tout dans un entonnoir stérile portant une tarlatane stérile (sous un couvercle en papier buvard stérile) et on répartit aseptiquement la masse filtrée dans des tubes à essai jusqu'à une hauteur de 5 à 6 centimètres cubes. On coagule à 70 degrés pendant deux heures en position inclinée à 15 degrés, puis on porte les tubes à l'étuve à 37° pendant trois jours, afin de rejeter ceux qui seraient contaminés. On les obture enfin avec des capuchons de caoutchouc.

Milieu de Lubenau

Même préparation que pour le milieu de Dorset, en additionnant le contenu de chaque œuf de 30 % de son poids de bouillon alcalin glycériné à 5 %.

Milieu de Besredka

Mélanger vingt jaunes d'œufs battus avec un litre

d'eau distillée neutre. Verser par petites portions une quantité de soude à 1 % égale à la moitié du volume total des jaunes; ajouter ensuite la soude par centimètre cube jusqu'à ce que le milieu soit parfaitement clarifié, ce dont on s'assure chaque fois par sa transparence sous un petit volume. En général, 10 centimètres cubes de soude ainsi ajoutés à la masse totale suffisent. Compléter avec de l'eau distillée neutre jusqu'à 7 litres.

Répartir en boîtes de Roux ou en tubes. Stériliser vingt minutes à 115°.

Milieu de Pétroff

Des œufs de poule sont immergés pendant quinze minutes dans l'alcool à 70°. On les casse, on mélange blancs et jaunes avec une baguette de verre flambée, et on filtre sur tarlatane stérile. A 400 centimètres cubes de filtrat, on ajoute 200 centimètres cubes de filtrat sur gaze de macération de viande fraîche de veau (250 gr. de viande hachée + 212 gr. d'eau distillée stérile + 37 gr. 5 de glycérine stérile, mise à macérer pendant une nuit à la glacière). On additionne le tout de 6 centimètres cubes (1 %) d'une solution alcoolique de violet de gentiane à 1 %. Après avoir mélangé intimément le colorant, on répartit en tubes, et on coagule en chauffant pendant 30 minutes à 85° le premier jour, 30 minutes le second et le troisième jour.

Milieu de Pétragnani

Dans un flacon d'un litre, mettre 150 centimètres cubes de lait neutre de vache, 6 grammes de fécule de pomme de terre, 1 gramme de peptone, et une pomme de terre de la dimension d'un œuf de poule coupée en morceau. Plonger le ballon dans l'eau bouillante, et l'y maintenir en assurant l'homogénéité du mélange par un mouvement de rotation. Quand la masse s'épaissit, c'est-à-dire après 8 à 10 minutes, cesser d'agiter, et laisser au bain-marie bouillant pendant une heure. Sortir ensuite le

ballon et le laisser refroidir jusque vers 56°, ajouter alors le contenu de quatre œufs, plus le jaune d'un cinquième œuf, 12 centimètres cubes de glycérine, 10 centimètres cubes de solution de vert malachite Hôchst à 2 % dans l'eau distillée. Bien mélanger par agitation, filtrer sur gaze stérile dans un ballon stérile, répartir stérilement en tubes. Coaguler en position inclinée par chauffage pendant 30 minutes à 85°. Stériliser de nouveau le lendemain par un chauffge de 30 minutes à 75° et sortir les tubes encore chauds.

Milieu de Hohn

Mélanger stérilement trois parties d'œuf frais entier et une partie de bouillon glycériné à 5 % non alcalinisé. Répartir le mélange en tubes et coaguler en position inclinée, en chauffant trois fois pendant une demi-heure à 75°; à 24 heures d'intervalle. Le milieu ne formant pas d'eau de condensation, on ajoute quelques gouttes de bouillon non alcalinisé, sans glycérine, au fond des tubes. Avant de procéder à la coagulation, on mesurera exactement le pH du milieu en en mélangeant 2 gouttes avec 15 centimètres cubes d'eau physiologique. Sa valeur doit être comprise entre 7,2 et 7.

Milieu Z. de Hohn à l'hématine

A 100 centimètres cubes d'œuf frais entier, bien mélangé par agitation pendant cinq minutes, on ajoute 3 centimètres cubes d'hémoglobine obtenue en hémolysant des globules rouges de mouton lavés, par un volume égal d'eau distillée stérile. Ce mélange prend un ton rouge brique. Ajouter alors 50 centimètres cubes de bouillon non alcalinisé glycériné à 10 % et additionné de 5 centimètres cubes de vert malachite à 1 %. Bien mélanger le tout, répartir dans des tubes à raison de 6 à 7 centimètres cubes par tube, et les laisser à la glacière pendant une demi-heure pour éviter la formation de bulles d'air dans le milieu. Coaguler en position inclinée

en chauffant pendant 30 minutes à 80°. Mettre au fond de chaque tube 0,8 centimètre cube environ de bouillon non alcalinisé sans glycérine.

Milieu de Loewenstein

On commence par préparer un liquide nutritif avec:

Phosphate monopotassique: 1 gr.
Asparagine: 3 gr.
Citrate de soude: 1 gr.
Glycérine à 30° neutre: 60 gr.
Sulfate de magnésium: 1 gr.
Eau distillée: 1.000 centimètres cubes.

Cette solution, portée deux heures à 100 %, se conserve sans s'altérer.

A 150 centimètres cubes de cette solution, on ajoute, dans un ballon stérile contenant des perles de verre:

Farine de pommes de terre (Merk): 6 gr.
Glycérine neutre à 30° stérilisée: 12 gr.

On ajoute et on chauffe à 100° pendant 15 minutes, puis une heure à 56°.

A ce mélange maintenu à 56°, on ajoute en agitant continuellement avec des perles de verre placées d'avance dans le vase stérile:

4 œufs complets plus 1 jaune d'œuf,
5 centimètres cubes d'une solution aqueuse stérile de vert malachite (Merck) à 2 %.

On peut substituer au vert malachite 10 centimètres cubes d'une solution aqueuse stérile à 2 % de rouge congo.

On filtre sur gaze stérile et on répartit en tubes stériles à raison de 5 à 6 centimètres cubes par tube. On tyndallise deux jours de suite à 80-86° en vapeur humide pendant deux heures chaque jour. On laisse les tubes

pendant 24 heures à l'étuve à 38° pour contrôler leur stérilité.

Milieu de Pétragnani à l'asparagine
(Modification de A. Saenz)

On fait dissoudre dans un vase stérile d'Erlenmayer d'un litre contenant 100 gr. de billes de verre stériles, et où l'on a préalablement versé 250 gr. de lait frais de vache et 16 gr. de fécule de pomme de terre (Vogue), 1 gr. 50 d'asparagine (Poulenc).

On fait bouillir au bain-marie en agitant fréquemment pendant une heure jusqu'à ce que le mélange prenne une consistance de purée épaisse; on refroidit jusqu'à 60°, et on ajoute huit œufs entiers et deux jaunes d'œufs. On agite et lorsque l'émulsion est bien homogène, on filtre à l'aide d'un entonnoir muni d'une gaze stérile. On ajoute au filtrat:

Glycérine stérile: 24 gr.,
Solution aqueuse de vert malachite à 2 %: 15 centimètres cubes.

On transvase ce mélange dans un appareil répartiteur, et on distribue en tubes de 19 millimètres de diamètre à raison de 8 centimètres cubes par tube. Ces tubes sont ensuite placés dans un appareil coagulateur à vapeur fluente à 85° pendant une demi-heure. On remplace alors les tampons de ouate servant à leur fermeture par des bouchons de caoutchouc massif pour éviter la dessiccation du milieu. On contrôle la stérilité des tubes en les laissant vingt-quatre heures à l'étuve avant leur utilisation.

Sensibilité comparée des différents milieux de culture

Les raisons qui doivent présider au choix d'un milieu de culture dans un but de diagnostic doivent être la

sensibilité du milieu et la rapidité d'apparition des colonies, la richesse de ces colonies étant d'un intérêt secondaire. Nous éliminerons ainsi les divers milieux de culture synthétiques ou liquides dont l'intérêt est, par ailleurs, très grand, pour étudier les germes, obtenir des corps microbiens ou la production de tuberculine.

Citons néanmoins les principaux d'entre eux : bouillon glycériné, milieu synthétique de Long, Preskaner et Beck, Besredka et Jupille, Sauton ; signalons au passage, avant d'y revenir, que certains d'entre eux, tel le milieu de Sauton peuvent, avec quelques artifices, comme nous l'avons fait nous-même, être utilisé pour l'ensemencement de produits pathologiques.

Parmi les milieux solides, la pomme de terre glycérinée doit être éliminée, elle est nettement moins sensible que le milieu à l'œuf, les colonies apparaissent beaucoup plus tardivement.

Von Huth et Lieberthal, dans des expériences destinées à les comparer l'ont très nettement établi.

Milieu à l'œuf		Pomme de terre glycèrinée	
Délai d'apparition des colonies	Nombre de tubes	Délai d'apparition des colonies	Nombre de tubes
8 jours	7	18 à 21 jours	8
9 à 12 —	65	22 à 28 —	29
13 à 16 —	83	29 à 35 —	69
17 à 20 —	76	36 à 42 —	16
Plus de 24 jours	27	Plus de 45 jours	20

Résumé global sur 300 tubes

	Milieu à l'œuf	Pomme de terre glycérinée
Tubes positifs.....	190	132
Tubes négatifs.....	93	141
Tubes contaminés.....	17	27

Ces milieux à l'œuf : Dorset, Lubenau, Pétroff, Hohn, Pétragnani, Loewestein et Petragnani, à l'asparagine, ne sont pas de valeurs équivalentes.

Au fur et à mesure de leur apparition, divers auteurs se sont attachés à comparer leurs valeurs respectives. Citons parmi eux : Walters et Dehmel, qui, en comparant le milieu de Pétragnani et de Hohn constatent que l'hématine du sang de mouton préconisée par Hohn ne favorise pas la culture des bacilles bovins.

Que le milieu de Pétragnani sans glycérine se montre supérieur, non seulement au milieu Z de Hohn avec ou sans glycérine, mais aussi au milieu additionné de glycérine. Il constatait également qe le milieu Z de Hohn permet de différencier les souches humaines des souches bovines, mais ne vaut pas le milieu de Pétragnani qui différencie mieux les souches bovines des souches aviaires.

Van Riemsdijk comparant le milieu de Lowenstein et celui de Lubenau-Hohn obtient des résultats plus rapides avec le milieu de Lowenstein.

Wang ensemence simultanément sur Lowenstein, Pétragnani et Sweany et Evanoff, ce dernier milieu leur donne des cultures plus épaisses, mais il est moins sensible et moins rapide.

Shaffer, après avoir traité à l'acide sulfurique à 6 % pratique quarante-deux ensemencements sur les milieux suivants : Pétragnani, Corper et Ugei, Lubenau, Pétroff, Sweany et Evanoff. C'est le milieu de Pétragnani qui donne les résultats les plus satisfaisants.

Césare Zach, en partant de 205 produits pathologiques suspects qu'il ensemence sur Pétragnani, Pétroff-Hohn, obtient avec les deux derniers, des résultats moins rapides et moins satisfaisants qu'avec le Pétragnani par lequel les résultats positifs atteignent les proportions suivantes :

Liquides pleuraux : 70 %,

Urines : 20,2 %,
Crachats : 34 %,
Fèces : 28 %,
Abcès froids : 87,7 œ,
Liquides céphalo-rachidiens : 100 %.

Saenz, Costil, se sont attachés à l'étude de ces divers milieux en vue de comparer leurs qualités respectives et principalement leur sensibilité. En partant de souches, l'une bovine dite souche Vallée, l'autre humaine ou souche Ratti, ils ont préparé des émulsions dans le milieu de Sauton pour attendre des dilutions de concentration décroissante jusqu'à 1/10.000.000e de milg. par centimètre cube. Les divers milieux étaient ensemencés et on notait les résultats en tenant compte du nombre de colonies et leur délai d'apparition.

Les résultats sont donnés par les tableaux suivants :

TABLEAU I. — (*Souche Bovine Vallée*)

Nombre de colonies après 30 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr.	Lubenau	Petroff	Hohn	Petragnani	Lœwenstein Rouge congo	Lœwenstein Vert malachite
0,000.1	11	1	11	18	innombrables	∞ innombrables
0,000.01 ...	0	0	0	3	2	
0,000.001 ..	0	0	0	0	0	0

TABLEAU II. — (*Souche Humaine Ratti*)

Nombre de colonies après 30 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr.	Lubenau	Petroff	Hohn	Petragnani	Lœwenstein Rouge congo	Lœwenstein Vert malachite
0,000.1	14	8	10	14	∞ innombrables	∞
0,000.01 ...	4	0	1	2		∞
0.000.001 ..	0	0	0	0	0	1

La supériorité du milieu de Loewenstein et Pétragnani ainsi établie, ils les comparent au milieu de Pétragnani modifié par Saenz.

TABLEAU I. — (*Souche Humaine Ratti*).

Nombre de colonies après 17 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr	Petragnani original	Petragnani modifié par A. Saenz
0,000.1	33	44
0,000.01	13	21
0,000.001	4	17
0,000.000.1	0	0

TABLEAU II. — *(Souche bovine Vallée)*

Nombre de colonies après 27 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr.	Petragnani originel	Petragnani modifié par A. Saenz	Loewenstein
0,000.1	54	72	10
0,000.01	7	9	2
0,000.000.1	2	2	67
0,000.000.1	0	0	0

Ce sont, à l'heure actuelle, les résultats les plus remarquables que l'on puisse obtenir avec de pareilles dilutions.

CHAPITRE II

Etude expérimentale de la méthode d'isolement à l'acide sulfurique

La méthode de culture que nous allons exposer, fait appel à l'action de l'acide sulfurique. Il semble, en effet, que parmi tous les essais proposés pour débarrasser les produits pathologiques des germes d'infection secondaire et réaliser un véritable isolement du bacille de Koch, ce soit elle qui corresponde le plus au but recherché. Celui-ci est double, il s'agit de tuer les germes d'infections secondaires et de ne pas altérer la vitalité du bacille de Koch. On doit également demander à la technique employée de faire appel à un minimum de manipulations et d'être rapide. Ajoutons une condition supplémentaire : il y a avantage à ce que le produit pathologique ainsi traité convienne aussi bien à l'ensemencement qu'à l'inoculation. Les résultats deviennent alors parfaitement comparables et peuvent être recherchés simultanément.

Nous ne revenons pas sur les étapes parcourues depuis les premiers essais d'isolement du bacille de Koch dans les produits secondairement infectés. Mais, précisons,

par contre, le procédé à l'acide sulfurique et ses bases expérimentales. Après Baussan et Bondy, Loewenstein, Hohn, Saenz et Sadettin étudient systématiquement les bases expérimentales de la méthode. Ils partent d'une solution d'acide sulfurique à 15 % dont le titre s'abaisse de moitié au cours des manipulations par addition du produit à ensemencer, ils neutralisent ce produit acide par de la soude à 30 % ajoutée goutte à goutte en présence de tournesol.

Action de l'acide sur les bacilles tuberculeux

Dans une première expérience, une émulsion de bacilles de la souche Ratti est mélangée avec des solutions d'acide sulfurique à 10, 20, 30 et 40 %. Le temps de contact variable était de 30, 45 et 60 minutes. Après neutralisation à la soude en présence de tournesol, ensemencement sur Lowenstein et Pétragnani à l'asparagine. Les bacilles de la première série (temps de contact 30 minutes), donnaient des colonies de développement identiques quelque soit la concentration d'acide avec celles obtenues à partir de bacilles témoins.

Mêmes résultats après 45 et 60 minutes de contact, mais les tubes ensemencés avec les bacilles correspondants aux concentrations de 30 et 40 % sont restés stériles.

Deuxième série d'expériences. Pour mettre en évidence l'action nocive de l'acide sulfurique sur le bacille de Koch, Saenz et Sadettin recommencent une nouvelle série de culture en employant des émulsions plus diluées contenant 0,001 à 0,000,01 mg. de bacilles par centimètre cube laissé pendant demi-heure au contact de l'acide sulfurique à 10, 15 et 20 %. Les résultats sont donnés par le tableau suivant :

Nombre de colonies après 39 jours

Quantité de bacilles ensemencés en mgr	Témoins	Traités par $SO^4 H^2$ à 10 %	Traités par $SO^4 H^2$ à 15 %	Traités par $SO^4 H^2$ à 20 %
0,001	innombrables	innombrables	innombrables	innombrables
0,000.1	—	210	97	70
0,000.01	150	150	70	35

Troisième expérience avec des bacilles aviaires.

Nombre de colonies après 30 jours

Quantité de bacilles ensemencés (mgr.)	Témoins	Traités par l'acide sulfurique à			
		5 %	10 %	15 %	20 %
0,001	innombrables	innombrables	400	75	40
0,000.1	—	400	95	75	40
0,000.01	—	300	73	80	25

Quatrième expérience,

action sur des bacilles paratuberculeux

(Voir le tableau page suivante)

Nombre de colonies après 40 jours

Quantité de bacilles ensemencés (mgr.)	Témoins	Traités par l'acide sulfurique à			
		5 %	10 %	15 %	20 %
0,001	innombrables	25	0	0	0
0,000.1	200	0	0	0	0
0,000.01	150	0	0	0	0

Il ressort de cet ensemble d'expériences que la nocivité de l'acide à la concentration de 10 à 40 % prolongée une 1/2 heure est nulle pour une suspension de bacilles de 0,1 mg. par centimètre cube. Il faut atteindre 30 et 40 % pendant 45 à 60 minutes pour qu'elle soit nettement nuisible. Pour des émulsions de 1 1.000 à 1 100.000 de mrg. de bacilles par centimètre cube, l'acide à 10 % n'altère pas la vitalité. Les bacilles aviaires sont légèrement plus sensibles. Les paratuberculeux ne résistent pas.

Action du sulfate de soude

On pouvait, à juste titre, se préoccuper de l'action du sulfate de soude formé par la neutralisation de l'acide sur les cultures de bacilles. Là encore, une série d'expériences pour lesquelles intervenant des solutions de sulfate de soude infiniment supérieures à celles que l'on peut obtenir au cours de la neutralisation ont montré que les bacilles de développaient sans aucune différence entre les témoins et des émulsions de bacilles de la solution saline.

On voit ainsi que la neutralisation à la soude en présence de tournesol ne présente aucun inconvénient. Cependant, quelques auteurs, surtout dans les pays germaniques la considèrent comme inutile et la suppriment.

C'est ainsi que dans la technique préconisée par Hohn après avoir passé au mortier le produit pathologique, on le traite pendant demi-heure avec une solution à 5 % d'acide sulfurique, on centrifuge, on rejette le liquide surnageant et on ensemence le culot ainsi obtenu sans le neutraliser ni le laver.

Ce procédé présente un inconvénient : il ne permet pas l'ensemencement et l'inoculation simultanée des produits pathologiques.

En outre, la méthode avec neutralisation à la soude offre l'avantage de produire une homogénéisation rapide des produits à ensemencer, de faciliter la recherche directe des bacilles de Koch et de supprimer la centrifugation.

Ainsi, en raison de sa simplicité et de la facilité de son emploi et de sa précision, c'est à cette méthode qu'il convient de donner la préférence toutes les fois qu'il s'agit de pratiquer l'isolement des bacilles tuberculeux en partant de produits pathologiques quelconques.

Techniques d'isolement des divers produits pathologiques

Les bases expérimentales que nous venons d'exposer de la méthode d'isolement à l'acide sulfurique, demandent quelques précisions supplémentaires quant à la conduite à tenir suivant les divers produits pathologiques que l'on désire ensemencer. Il est bien évident qu'en face d'un liquide céphalo-rachidien à peine opalescent et d'un ganglion suspect de bacillose, des techniques diverses dont les bases expérimentales demeurent évidemment les mêmes, doivent être établies.

Nous allons donc passer en revue les divers produits pathologiques susceptibles d'ensemencement pour recherche du bacille de Koch, en indiquant pour chacun d'eux les particularités qui interviennent dans les manipulations, et les résultats que l'on peut obtenir.

Expectoration

Au cours des chapitres précédents, nous avons eu l'occasion de voir combien avaient été nombreux les essais d'ensemencements de crachats, ce sont eux également qui ont provoqué les premiers essais de culture.

En plus de la nécessité d'éliminer les germes d'infection secondaire sans altérer la vitalité du bacille de Koch, une difficulté particulière réside dans la nécessité de dissocier les mailles mucopurulentes et les leucocytes dans lesquels il se trouve enrobé pour lui permettre d'abord le contact avec l'acide, puis avec la surface du milieu.

Ne revenons pas sur les méthodes au formol, à l'antiformine, ni même sur la méthode à la soude de Pétroff. La méhode à l'acide sulfurique justifie la faveur dont elle jouit actuellement.

Il y a intérêt à séparer les parties purulentes du crachat d'avec la salive ou les parties d'expectoration plus liquides qui sont très pauvres en bacilles ou n'en contiennent pas du tout. Une véritable dissociation de la masse bacillifère doit alors être réalisée au mortier, en triturant pendant cinq minutes environ jusqu'à obtention d'un aspect uniforme. L'action de l'acide est alors régulièrement obtenue et la liquéfaction du crachat parfaite. Dans le mortier même, on ajoute un égal volume d'acide sulfurique à 15 % pendant une demi-heure à la température du laboratoire, ou mieux, à l'étuve à 37°. On ajoute une ou deux gouttes de tournesol comme réactif indicateur et on neutralise avec une solution de soude à 30 % jusqu'à obtention d'un virage lilas (limite de neutralité à pH = 7,2). On ensemence alors à raison de 0,5 centimètre cube par tube, cinq tubes au moins de milieu à l'œuf de Pétragnani modifié par Saenz. On peut également, grâce à la neutralité du produit, procéder à une inoculation au cobaye. D'autre part, à la suite de ces diverses manipulations, une véritable homogénéisa-

tion des crachats a été réalisée et un examen direct à ce moment, présente un intérêt tout particulier.

Pus

Les pus d'abcès froids, si souvent infectés secondairement donnent des résultats particulièrement décevants, quel que soit le procédé d'homogénéisation et la patience du chercheur lorsqu'on pratique la bacilloscopie.

La culture est, par contre, fort aisée et fructueuse. On opère comme pour les crachats, le pus ainsi traité arrive à un bon résultat de fluidification et peut ainsi être répandu en couche unie et mince à la surface du milieu.

Liquides pleuraux et articulaires

On sait combien rares sont les cas d'épanchements séro-fibrineux où l'examen direct permet de mettre le bacille de Koch en évidence, bien que le diagnostic étiologique ne soit pas douteux. La méthode de culture donne des résultats particulièrement satisfaisants, certaines statistiques apportent jusqu'à 80 % de résultats positifs, mais en moyenne, les résultats oscillent autour de 50 %. Deux cas sont à distinguer selon que l'on se trouve en présence de liquide non secondairement infecté ou contaminé par une flore secondaire.

De toute façon, le liquide devra être recueilli sur billes de verre ou sur 2 cc. de citrate de soude à 10 % pour éviter la formation d'un coagulum. Si cependant ces précautions n'ont pas été prises, le coagulum sera détruit au mortier ; c'est à partir de lui, en effet, qu'il est intéressant de faire un ensemencement, les mailles du système fibrineux du coagulum enserrent les bacilles comme dans un véritable filet ; ils se trouvent ainsi rassemblés aussi bien que pourrait le faire une centrifugation prolongée. La formation de ce coagulum n'est cependant

pas souhaitable à cause des manipulations supplémentaires qu'elle fait entrer en jeu.

Liquides non secondairement infectés. Après les avoir recueillis aseptiquement sur billes de verre ou citrate de sodium, on ensemence directement sur les milieux à raison de 1/2 centimètre cube par tube.

Liquides secondairement infectés. 15 à 20 cc. d'exsudat pleural sont recueillis sur billes de verre ou citrate de soude, on centrifuge pendant un quart d'heure; le culot, additionné d'un égal volume d'acide sulfurique à 15 % est dissocié au mortier et on laisse en contact un quart d'heure. Après addition de quelques gouttes de tournesol, on neutralise avec une solution de soude à 30 % jusqu'à teinte lilas; l'ensemencement est alors effectué.

Liquide céphalo-rachidien.

C'est là un des cas où le triomphe de la méthode d'ensemencement des produits pathologiques suspects de bacillose, est particulièrement éclatant. Le pourcentage des cultures positives atteint, chez les auteurs qui ont fait appel à la culture, presque toujours 100 %.

Comme il s'agit très exceptionnellement de liquides infectés secondairement et qu'il est facile de les recueillir aseptiquement, l'ensemencement n'a pas besoin d'être précédé de contact avec l'acide, on le fera directement à raison d'un demi centimètre cube par tube; s'il se trouve quelques flocons fibrineux, l'opérateur aura soin de les écraser délicatement à la surface du milieu de culture, sans blesser ce dernier.

Urines

Dans le diagnostic de la tuberculose rénale, le diagnostic bactériologique joue un rôle prépondérant. Si, pour un grand nombre de cas, l'examen direct suffit à

mettre le bacille de Koch en évidence, nombreux sont également les cas, où, devant une pyurie amicrobienne, une cystite suspecte, une tumeur épidydimaire, l'examen direct si prolongé, si attentif soit-il, ne suffit pas. La culture doit alors entrer en jeu. Elle apporte, en effet, des résultats d'une sensibilité remarquable et dans un délai de temps assez court, dans bien des cas, cette considération est d'une importance essentielle. C'est une des utilisations les plus fréquentes en pratique hospitalière de la méthode de culture.

Voici la technique d'ensemencement : s'il s'agit d'urines claires on en centrifuge environ 300 centimètres cubes, mais si elles sont troubles ou sanguinolentes, 40 à 50 centimètres cubes suffisent. On peut aussi se servir du sédiment obtenu par simple décantation à 500 centimètres cubes d'urine laissés vingt-quatre heure à la température du laboratoire. Le culot ou le sédiment est aspiré avec une pipette graduée et déposé dans un mortier stérile, puis broyé jusqu'à homogénéisation complète. 3 à 5 minutes suffisent en général, traiter ensuite, pendant 20 à 30 minutes, par un égal volume d'acide sulfurique à 15 %, si l'infection secondaire paraît intense. Lorsque la flore microbienne est peu abondante, l'action de l'acide sulfurique à 10 % pendant 15 à 20 minutes suffit. Après avoir ajouté quelques gouttes de tournesol comme réactif indicateur, on neutralise à la soude à 30 ou 20 %, selon la concentration d'acide utilisée jusqu'à teinte lilas qui correspond à la neutralité.

Le culot ainsi traité est ensemencé à raison d'un demi centimètre cube par tube de milieu.

Si une inoculation doit être pratiquée simultanément, le culot traité est directement utilisable.

Les culots de centrifugation de pyuries amicrobiennes peuvent être ensemencées directement sans traitement à l'acide sulfurique, à condition de pouvoir s'étaler en couche unie et mince à la surface des milieux.

Les auteurs qui se sont attachés à l'étude de l'ensemencement des urines ont été unanimes pour en constater les avantages. En particulier Saenz et Eisendrath, sur 57 cas suspects de tuberculose rénale, obtiennent 27 résultats négatifs avec résultat semblable à l'examen direct et après inoculation. 20 cas, qui présentaient des bacilles à l'examen direct ont donné des cultures positives dans des délais de 8 à 15 jours. 10 autres qui ne présentaient pas de bacilles après un examen direct prolongé ont donné des résultats de culture positifs dans des délais de 8 à 30 jours.

Liquide gastrique

La recherche du bacille de Koch dans le liquide gastrique offre un intérêt tout particulier chez les enfants qui ne savent pas cracher et déglutinent leurs expectorations. Le liquide gastrique sera prélevé le matin au réveil de préférence à la sonde œsophagienne, il sera ensuite centrifugé, puis le culot dissocié soigneusement au mortier, sera traité à l'acide sulfurique à 15 % pendant une demi-heure et neutralisé à la soude à 30 % en présence de tournesol. L'ensemencement se fera à raison d'un demi centimètre cube de produit ainsi traité par tube de milieu. Le prélèvement du liquide gastrique fait et ce dernier centrifugé, le problème se ramène à un ensemencement de crachats.

Selles

La recherche directe du bacille de Koch dans les selles est très souvent vicié par la présence de bacilles paratuberculeux, qui existent en très grand nombre dans les matières fécales. La culture est donc tout particulièrement indiquée, cependant la présence des microbes sporulés anaérobies de l'intestin, qui résistent à l'action de l'acide sulfurique à 20 et même 25 % pendant 30 minutes, ce qui risque d'atteindre gravement la vitalité des bacilles tuberculeux, complique le problème. Besan-

çon et Braun, après avoir homogénéisé les selles avec de la soude les traitent par quelques centim. cubes d'une solution antiseptique d'oxyquinoléate de soude à 1/500e, qui empêche le développement de germes secondaires.

Tissus

On a rarement l'occasion de pratiquer des ensemencements de biopsie en vue de rechercher le bacille de Koch; par contre, en présence de cobayes inoculés dont les organes ne présentent pas de lésions typiques, la culture, à partir de ces organes, présentent un intérêt évident. Ceux-ci sont prélevés aseptiquement, broyés à sec au mortier avec du sable stérile, on ajoute de l'eau en quantité variable suivant la consistance du produit. On procède alors au traitement à l'acide sulfurique à 15 % pendant une demi-heure, puis on neutralise à la soude à 30 % en présence de tournesol. Le produit ainsi traité est suffisamment liquide pour être ensemencé à raison d'un demi centimètre cube par tube.

Sang

Il n'entre pas dans cette étude de donner même un simple aperçu sur le problème de la bacillémie tuberculeuse, la somme de travaux et les discussions passionnées qu'ont provoqués les travaux de Loewenstein représente une masse énorme de publications. Exposons seulement la méthode.

Le sang peut être ensemencé directement ou après avoir été recueilli sur citrate de soude ou laqué par adjonction d'eau distillée, on le centrifuge alors fortement, le liquide surnageant rejeté, le culot est lavé à l'eau distillée et ensemencé sur les milieux de culture.

Les tubes de milieu, une fois ensemencés, et quel que soit le produit pathologique dont on est parti, sont placés à l'étuve à 38° en position presque horizontale; on dispose habituellement de supports spéciaux qui les maintiennent avec une inclinaison d'environ 15°. On

aura pris la précaution de garnir l'extrêmité des tubes de chapeaux de caoutchouc pour éviter la dessication trop rapide des milieux dans l'étuve; ils sont, en effet, appelés à y séjourner quelquefois pendant près de deux mois. Il n'est cependant pas utile, comme certains auteurs l'ont recommandé, de renforcer l'étanchéité du système par une mince couche de paraffine. Les capuchons de caoutchouc auront été préalablement stérilisés par ébulition dans une solution de fluorure de sodium. Le nombre de tubes à ensemencer ne sera pas inférieur à 5, non seulement parce que cela permet de multiplier les chances de succès, surtout quand on a affaire à des produits paucibacillaires qui sont les plus intéressants, mais aussi parce que le danger de contamination par des moisissures demeurent toujours possible et d'autant plus dangereux qu'au cours du long séjour à l'étuve, si celles-ci se développent, la totalité des milieux est alors envahie.

CHAPITRE III

Les résultats

Les avantages de la méthode sont de plusieurs ordres; sa simplicité découle de la technique d'ensemencement que nous venons d'exposer. Il nous reste encore à développer le délai d'apparition des colonies et leurs caractères particuliers, suivant qu'il s'agit de souches humaines, bovines ou aviaires.

Les délais d'apparition des colonies microbiennes sont assez variables, il est exceptionnel que les colonies apparaissent nettement visibles avant le douzième jour; un milieu qui est resté stérile le soixantième jour peut être considéré comme ne devant pas donner de colonies. En moyenne, les résultats donnés par les diverses statistiques sont échelonnés entre le quatorzième et le trentième jour.

Saenz et Costil, dans leur monographie sur le diagnostic bactériologique de la tuberculose, apportent les résultats suivants, qui portent sur 29 liquides céphalo-rachidiens, 15 épanchements séro-fibrineux de la plèvre, 73 crachats, 30 urines.

Jours	29	15	73	30
	L C R	Liquides pleuraux	Crachats	Urines
10			2	
11				
12			4	
13	1		4	
14			2	
15	1		3	3
16	2		6	2
17	4		5	2
18	3		3	5
19	3		5	4
20			2	1
21	3	2	11	1
22	2	1	4	1
23	1		4	1
24	2	1		
25	2	1	3	1
26		1	1	1
27	2	1	5	2
28			2	
29				1
30	1		2	
31		1		
32				
33		1		
34				
35		1	1	1
36				
37				1
38				
39				
40	1			
41		1		
42				
43				
44				
45	1			
60				1

Ces résultats, sensiblement plus rapides que ceux que l'on obtient des méthodes d'inoculation au cobaye, ont

pu cependant paraître trop longs encore à obtenir. Divers auteurs, en particulier Saenz Costil, Maneau, Valtis et Eisendrath en France, Bonino, Bruni et Di Pierro en Italie, ont préconisé une méthode de diagnostic accélérée: c'est le râclage des milieux bien avant l'apparition des colonies, tel que le pratiquait systématiquement Lowenstein, mais ici, il s'agit d'un examen anticipé et non d'une recherche supplémentaire.

L'avantage de cette pratique est double: Mise en évidence très rapide des bacilles, la micro-culture peut être positive dès le cinquième jour (en moyenne du huitième au douzième); elle réalise aussi un véritable repiquage, d'où apparition de colonies longuement étalées et par conséquent beaucoup plus riches.

Pour cette recherche des micro-cultures, voici comment procéder. Toute la surface du milieu est soigneusement râclée avec une anse de platine, en évitant de faire des écorchures ou des sillons. La manipulation aura lieu près d'un bec Bunsen allumé pour éviter que le milieu ne se contamine par des moisissures; il doit, en effet, passer encore un long séjour à l'étuve.

Le produit de râclage est ensuite étalé à la surface d'une lame de verre et coloré selon le procédé de Ziehl-Neelsen, et examiné au microscope. Le premier examen sera assez précoce, vers le cinquième ou le sixième jour, et s'il est négatif, recommencé avec d'autres tubes. L'examen direct sera très soigneusement fait et prolongé assez longtemps. Il doit mettre en évidence des bacilles alcoolo-acido-résistants typiques, rarement isolés, le plus souvent groupés en petits amas, véritables débuts de colonies.

L'intérêt d'un pareil procédé est évident, mais n'est-il pas exposé à de sévères critiques? Bruni, considère que les résultats sont aussi sûrs que ceux de l'épreuve biologique. Bonino trouve, dans la recherche des micro-colonies, des résultats constants et rapides; il estime que l'on ne peut pas rencontrer dans les urines des

germes acido-résistants pouvant se confondre avec le bacille de la tuberculose et il conclue que pour toutes ces raisons, la méthode des micro-cultures par le diagnostic du bacille de la tuberculose, ne peut être faussé, même si l'urine n'est pas prélevée avec une sonde.

Saenz et ses collaborateurs, Costil et Eisendrath ne sont pas aussi affirmatifs ou du moins introduisent une restriction, en précisant qu'il s'agit de micro-colonies repiquables. Il existe, en effet, des micro-colonies non repiquables : de quoi s'agit-il ? Nous avons déjà signalé, au sujet des causes d'erreurs de l'examen direct et de l'homogénéisation, la présence toujours possible de bacilles acido-alcoolo-résistants non tuberculeux ou de cadavres de véritables bacilles de Koch. Ces mêmes germes peuvent se retrouver à la surface des milieux de cultures, soient qu'ils proviennent des produits pathologiques ensemencés, soit qu'ils proviennent du milieu lui-même où ils ont été introduits avec le lait ou les œufs. Et voilà pourquoi Saenz et ses collaborateurs précisent micro-colonies repiquables. Les bacilles morts ne se reproduisent pas et ceux que la culture recherchent, ce sont les bacilles vivants et qui se multiplient au point de donner des colonies macroscopiquement visibles. La culture du bacille de Koch est une véritable épreuve biologique. La présence des micro-cultures à la surface des milieux ne saurait donc pas autoriser le laboratoire à donner une réponse formelle, il ne s'agit pas d'une preuve scientifiquement établie. Il n'en demeure pas moins vrai qu'en s'entourant de toutes les précautions possibles, l'existence des micro-cultures constituent un renseignement précieux ; la présence de bacilles acido-résistants non tuberculeux est rare, leur présentation en petits amas est exceptionnelle ; quant aux bacilles provenant des milieux eux-mêmes, il est facile d'examiner des tubes témoins provenant du même lot que les milieux en cause. La micro-culture constitue donc un renseignement remarquablement précoce, mais ne doit avoir la valeur que d'une simple orientation.

Il est bon de ne pas pratiquer la recherche des micro-

cultures à la surface de tous les milieux ensemencés, le repiquage qui en résulte donnant des cultures largement étalées et ne permettant pas d'apprécier la richesse en germes du produit pathologique ensemencé.

Les macro-colonies

L'apparition des colonies distinctement visibles à l'œil nu est assez rapide, nous venons de le signaler; leur examen présente un intérêt particulier. Les colonies se présentent, en effet, avec une physionomie particulière selon qu'il s'agit de souches humaines, bovines ou aviaires et l'on voit tout l'intérêt que cela représente. Pour obtenir des colonies à caractères nettement tranchés, une précaution est nécessaire : les milieux doivent avoir une certaine fermeté et c'est pourquoi, lors de la préparation des milieux, il y a intérêt à coaguler à la chaleur sèche et non en vapeur fluente, comme le recommande Lowenstein. Sans quoi, avec les milieux à l'œuf trop humide, toutes les souches ont une tendance à fournir des colonies plus ou moins lisses, ce qui nuit à leur identification. Notons encore que la morphologie d'une colonie est un renseignement qui ne suffit pas, il ne faut jamais manquer de vérifier que ces colonies sont formées de bacilles acido-alcoolo-résistants. Cette précaution est indispensable car certains champignons streptothricéés sarcines et d'autres bactéries du groupe coryné bactérium, peuvent apparaîtrent tardivement et présenter la morphologie des colonies des bacilles tuberculeux.

Caractères des cultures de bacilles tuberculeux humains sur milieu de Loewenstein

L'ensemencement de produits tuberculeux provenant de la clinique humaine, contaminés ou non par une flore secondaire banale, peut donner, sur milieu de Loewenstein, des cultures de bacilles de Koch qui présentent différents aspects.

Dans la plupart des cas, le germe isolé est un bacille humain. Les caractères culturaux sont alors les suivants :

Les colonies apparaissent en moyenne entre 11 et 29 jours. Il est exceptionnel de les apercevoir en dehors de ces limites extrêmes. Si le produit a été ensemencé d'une manière correcte, les colonies sont réparties régulièrement à la surface du milieu et leur nombre varie avec chaque échantillon ensemencé. En raison de la facilité avec laquelle elles se développent *in vitro*, Griffith (1907) les a dénommées « cultures eugoniques ».

Dès leur apparition, ces colonies sont sèches, rugueuses, à contours irréguliers, légèrement pigmentées en jaune. Au fur et à mesure de leur séjour à l'étuve, elles augmentent de volume et après quelques semaines, elles atteignent leurs dimensions définitives, c'est-à-dire 8 à 12 millimètres de diamètre et 2 à 4 millimètres de hauteur ; elles ont alors une forme caractéristique en choux-fleur et sont parfois pigmentées en rouge jaunâtre. A la spatule, elles se détachent facilement du milieu auquel elles n'adhèrent pas ; elles s'étalent avec difficulté à la surface du milieu et s'émulsionnent très difficilement dans l'eau physiologique où elles forment de nombreux grumeaux.

Reportées sur milieu à l'œuf et surtout sur pomme de terre glycérinée, elles fournissent une culture qui se développe, dès les premiers réensemencements, facilement et rapidement, en deux ou trois semaines d'étuve. L'aspect sec, rugueux, poudré, caractéristique du bacille humain, est toujours conservé, d'où le nom de colonies R (*rough*, rugueux), que leur donnent les auteurs anglais.

Sur les milieux liquides, bouillon glycériné ou Sauton, la culture forme un voile en surface, rugueux, plissé et sec dont le développement s'effectue en trois ou quatre semaines. Par agitation, ce voile tombe sans troubler le milieu, mais, en quelques jours, il se reforme avec des caractères semblables.

Caractères des cultures de bacilles tuberculeux bovins sur milieu de Loewenstein

Les cultures primaires de bacilles bovins, ont un aspect tout différent de celles de bacilles humains. En premier lieu, l'apparition des colonies est beaucoup plus tardive, entre 30 et 70 jours. Les colonies, en nombre restreint, ne se développent souvent pas sur tous les tubes ensemencés. Au début, elles sont très petites, visibles seulement à la loupe, rondes, transparentes et sur les frottis et se montrent formées de bacilles acido-résistants très courts. Elles atteignent leurs dimensions définitives après plusieurs semaines d'étuve durant lesquelles elles se développent très lentement; elles dépassent rarement 3 à 4 millimètres de diamètre, environ la grosseur d'une tête d'épingle. Elles se présentent le plus souvent à l'état isolé sous forme hémisphérique, à bords réguliers, parfaitement rondes, blanc nacré, jamais pigmentées au moment de l'isolement; elles sont humides, brillantes et lisses, d'où le nom de variété S (*smooth*) que leur ont donné les auteurs anglais. En raison de leur difficulté à s'adapter dans les milieux *in vitro*, Griffith les a dénommées « cultures dysgoniques ».

Ces colonies sont adhérentes aux milieux à l'œuf qu'elles décolorent après un séjour prolongé à l'étuve. A la spatule, elles ont une consistance tout à fait différente de celle des bacilles humains qui permet leur étalement facile à la surface du milieu. Elles s'émulsionnent facilement en eau physiologique en produisant un trouble homogène et durable.

Au cours des premiers passages sur milieux à l'œuf et sur pomme de terre glycérinée, le bacille bovin fournit, après plusieurs semaines d'étuve, des cultures dysgoniques qui se développent très lentement et difficilement en conservant l'aspect lisse primitif.

Ensemencées dans les milieux liquides, Sauton ou

bouillon glycériné, les cultures secondaires croissent en profondeur en troublant le milieu, mais il finit toujours par se former en surface un voile mince qui, de temps en temps, tombe en flocons.

Quant les cultures de bacilles bovins ont pris l'aspect rugueux et eugonique, il est impossible, par leur simple aspect cultural, de les différencier de celles de bacilles humains.

En résumé, dans la pratique courante et dans la plupart des cas, il est facile de distinguer, par l'aspect des cultures, les deux types de bacilles des mammifères: apparition rapide des colonies de bacilles humains, plus lente pour celles de bacilles bovins, croissance facile eugonique pour les premières, difficile dysgonique pour les dernières, cultures rugueuses, sèches, mamelonnées, pigmentées, difficilement émulsionnables dans le premier cas, lisses, humides, petites, non pigmentées, décolorant le milieu, facilement émulsionnables dans le second, sous-cultures dans les milieux liquides ou solides abondantes, faciles et rapides avec l'aspect R caractéristique pour les bacilles humains, réduites, lisses et dysgoniques pour les bacilles bovins.

En tenant compte de ces principaux caractères, il est assez aisé de différencier les deux types bien que, pour confirmer le diagnostic, il soit toujours nécessaire de s'adresser ensuite à l'inoculation au lapin.

Caractères des cultures de bacilles tuberculeux aviaires sur milieu de Loewenstein

Les cultures de bacilles aviaires sont constituées par des colonies lisses, comme celles de bacilles bovins, mais elles apparaissent beaucoup plus rapidement, entre le neuvième et le quatorzième jour et se développent très facilement et abondamment.

Les cultures primaires peuvent présenter deux aspects

nettement différents. Dans un cas, les colonies sont isolées, hémisphériques circulaires, blanc nacré, lisses, plus humides et luisantes que celles de bacilles bovins; leur diamètre varie entre 3 et 5 millimètres.

Le second aspect est donné par une culture se développant en nappe luisant, humide, crèmeuse et plate.

Quelle que soit la manière dont elles se présentent, les colonies de bacilles aviaires sont toujours adhérentes au milieu et facilement émulsionnables en eau physiologique dans laquelle elles forment un trouble homogène.

Dans les milieux liquides, bouillon glycériné ou Sauton, elles se développent en profondeur, en les troublant uniformément durant la première semaine d'étuve. Ensuite, elles forment une mince pellicule en surface qui tombe facilement au fond du vase en fins grumeaux; le voile conserve indéfiniment un aspect gras et adhère aux parois du ballon de culture.

Réensemencé sur milieu à l'œuf et sur pomme de terre glycérinée, le bacille aviaire donne rapidement, en douze à quatorze jours, une culture abondante, toujours crèmeuse, lisse et humide.

Comme avec le bacille bovin, au fur et à mesure des passages sur pomme de terre glycérinée, l'aspect des souches de bacilles aviaires se modifie; leur surface se plisse d'abord progressivement en nombreuses circonvolutions en même temps qu'elles deviennent moins humides et moins grasses qu'au moment de l'isolement; simultanément, on observe, sur le bouillon, l'apparition d'un voile mince et humide; à ce moment, il est facile de constater sur le fond lisse de la culture, quelques colonies nettement différentes, rugueuses, sèches et à contours irréguliers. Autrement dit, comme pour le bacille bovin, il s'opère une véritable dissociation. Par repiquage de ces colonies ou en continuant les passages sur pomme de terre glycérinée, on obtient finalement une culture rugueuse sèche identique à celle des bacilles de mammifères.

Dans cette phase, il est impossible de distinguer le bacille aviaire du bacille humain ou bovin eugoniques.

Caractères des cultures de bacilles acido-résistants para-tuberculeux sur milieu de Loewenstein

A l'encontre des bacilles des mammifères, les cultures de para-tuberculeux se développent facilement en quelques jours. Le plus souvent, ces colonies sont intensément pigmentées du jaune or à l'ocre foncé. D'autres secrètent des pigments roses ou rouges qui sont constitués par des lipochromes; plus rarement on isole des souches de saprophytes non pigmentés d'un blanc ivoire caractéristique.

Pigmentées ou non, ces souches se présentent, sur milieu de Loewenstein, sous la forme de colonies lisses, humides, crèmeuses, souvent visqueuses, isolées ou confluentes. Exceptionnellement, la culture est sèche, écailleuse, plissée et mamelonnée, ayant l'aspect rugueux comme celle du bacille de Koch.

Ces souches se développent entre des limites de température extrêmes. Entre 10 et 15°, elles poussent lentement, mais leur prolifération s'effectue plus rapidement entre 15 et 25° et surtout entre 25 et 28°; elle se poursuit jusqu'à 50-55° et pour certaines d'entre elles, jusqu'à 58°.

Ce caractère permet de les distinguer d'emblée des bacilles humain, bovin et aviaire qui ne croissent qu'entre des limites très étroites de température, 32 à 39° pour les bacilles des mammifères, jusqu'à 45° pour le bacille aviaire.

Leurs exigences nutritives minimes leur permettent de se développer rapidement et abondamment, non seulement sur pomme de terre glycérinée, mais également sur des milieux liquides ou solides non glycérinés.

Valeur des résultats

Les résultats de la culture ainsi précisés appellent la discussion sur quelques points particuliers. Il est indiscutable qu'en présence d'une culture positive du produit pathologique, on est en droit d'affirmer la présence de bacilles de Koch dans le produit ensemencé. Mais en présence d'une expectoration ou d'une urine dont le caractère bacillifère est ainsi démontré, peut-on conclure à l'existence d'une bacillose pulmonaire ou rénale? C'est seulement de la collaboration étroite du laboratoire et de la clinique qu'il est possible de former les arguments propres à nous éclairer. Il n'entre pas dans le cadre de cette étude d'envisager le fond de la culture. Précisons seulement que l'on ne doit pas oublier l'existence rare mais toujours possible de cracheurs de bacilles de Koch sans lésions apparentes. Bezançon, Bran et Crudes, Meyer, en ont signalé d'assez nombreux cas que des recherches systématiques avaient permis de déceler. L'existence de bacillurie sans tuberculose rénale ni altération du rein a été soutenue par quelques auteurs, Fulleston, Jousset, Sturn. Cette question a fait l'objet de nombreuses recherches tant cliniques qu'expérimentales. Baccanu, Spizer, Willams, Dimtza et Schaffhauzer, Nasta, Saenz, Deist, Monton, après avoir ensemencé des urines de tuberculeux au cours de cures sanatoriales ou en traitement dans les hôpitaux, n'ont jamais pu mettre le bacille en évidence, si ce n'est dans les cas où un examen urologique permettait de constater l'existence d'une tuberculose uro-génitale.

Cette question de la bacillurie des tuberculeux peut, aujourd'hui, être considérée comme parfaitement élucidée : il n'y a pas de bacille de Koch dans les urines sans lésions rénales.

CHAPITRE IV

L'Inoculation, valeur comparée avec la culture

Les techniques d'inoculation

Les techniques de culture étant étudiées, il nous paraît intéressant de comparer les résultats obtenus avec ceux que l'on obtient des méthodes d'inoculation. Appliquée depuis très longtemps, l'inoculation au cobaye des produits suspects de bacillose peut être considérée comme un véritable procédé d'enrichissement, destiné à obtenir la multiplication *in vivo* des bacilles de Koch, beaucoup plus que comme destiné à rechercher le caractère de virulence de ces mêmes bacilles ; l'inoculation au cobaye présente, en effet, de très nombreuses qualités. Elle joint à la précision une remarquable sensibilité.

L'inoculation se fera de préférence avec des produits pathologiques préalablement traités par l'acide sulfurique, puis neutralisés à la soude comme pour l'ensemencement. En effet, certains produits, tel que le pus, les matières fécales, provoquent fréquemment, au point

d'inoculation, un abcès qui s'ouvre spontanément en peu de jours, évacuant la totalité de la matière injectée.

Diverses méthodes ont été préconisées pour l'inoculation. La plus simple et la plus couramment employée est l'inoculation sous-cutanée de préférence dans la région de l'aine, entre le mamelon et le pli inguinal et d'un seul côté. A partir du quinzième jour, en comparant attentivement par le palper les deux régions inguinales, on sent, si le résultat doit être positif, un léger relief ganglionnaire du côté inoculé. A dater de ce moment, le ganglion ira grossissant de semaine en semaine. Quoique induré, il restera longtemps libre et peu sensible. Lorsqu'on a des produits très bacillaires ou des bacilles très virulents, la réaction ne se cantonne pas au ganglion, il se fait un abcès froid avec une escarre dont la chute amène une ulcération rebelle appellée chancre. On peut attendre la mort qui survient au bout de quatre, six ou huit semaines, mais parfois la maladie est beaucoup plus longue et la réponse de l'inoculation se fait attendre un peu trop au gré de la clinique. On peut sacrifier l'animal au bout de six semaines à deux mois. Pour pratiquer l'autopsie, étendre le cobaye sur le dos et opérer avec des ciseaux une grande incision cervico-pubienne. La masse viscérale explorée organe par organe, les régions ganglionnaires étudiées minutieusement montrent des ganglions dans la région inguinale injectée, dans la région mésantérique, dans la région trachéo-bronchite; les ganglions ont, en général, une périphérie dure et un centre caséeux blanc mat. Le péritoine porte, en proportion variable, des granulations tuberculeuses. Le foie et la rate fortement hypertrophiés sont parsemés de granulations à la surface et dans la profondeur, marbrés de zones dégénérative et hémorragique. Cet ensemble constitue un tableau connu sous le nom de tuberculose de type Villemin.

Nous préférons à cette méthode d'inoculation sous-cutanée, la méthode par injection intra-ganglionnaire décrite par Ninni. C'est une méthode commode qui a l'avantage de donner le résultat dans les cas favorables

en quelques jours. Voici quel en est la technique. Le cobaye, anesthésié, est solidement fixé sur un appareil de contension, la tête en hyper-extension forcée. Une incision médiane de la peau, puis du plan aponévrotique du cou permet d'apercevoir les ganglions latéro-trachéaux qu'il est presque toujours aisé de faire saillir en les prenant entre 2 instruments mousses. Lorsqu'on n'est pas encore familiarisé avec cette technique, la confusion avec un lobe des deux grosses glandes salivaires sous-maxillaire est fréquente. Un moyen simple de différenciation consiste à comprimer légèrement, entre les mors d'une pince, ce qu'on croit être le ganglion. S'il s'agit d'un lobe de la glande, il garde sa teinte rosée. S'il s'agit bien du ganglion, il prend, sous l'effet de la compression, une teinte jaune bien caractéristique ; on pique alors un des pôles avec une aiguille très fine (aiguille à intradermo) et on injecte le filtrat jusqu'à refus. Là encore, la teinte jaune caractéristique indique que le ganglion a été bien injecté. On referme la petite plaie avec une agrafe et l'on met un pansement léger. Les modifications de volume et de consistance du ganglion sont très faciles à suivre sous la peau. Il n'y a pas de chancre d'inoculation.

Une excellente pratique consiste à suivre l'évolution de l'infection bacillaire chez le cobaye en recherchant son comportement vis-à-vis d'injections intra-dermiques de tuberculine. Après avoir épilé la peau de l'abdomen, on injecte dans le derme 1/20e de centimètre cube de tuberculine ou 1/10e ; l'animal commence à réagir vers le quinzième jour ou au début de la troisième semaine. On peut également soumettre le cobaye à des injections bi-hebdomadaires sous-cutanées de 1 centimètre cube d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux ; lorsque ces injections ont été poursuivies pendant quelques semaines, on constate que les animaux traités maigrissent plus rapidement que les témoins et meurent plus précocément en présentant des lésions plus disséminées et plus étendues.

Les méthodes d'inoculation au cobaye sont-elles à l'abri de toutes critiques ? Evidemment non. En premier

lieu, le prix d'achat des animaux et les dépenses nécessaires pour leur entretien ont fait souvent réserver la méthode à des cas exceptionnels. La durée de l'incubation de la maladie expérimentale chez le cobaye vient encore compliquer la méthode. Il faut savoir attendre souvent fort longtemps pour conclure que l'animal n'a pas été tuberculisé. Dans les cas où les bacilles sont rares et peu virulents, si l'on sacrifie le cobaye deux mois après l'inoculation, on risque de le trouver macroscopiquement sain. De plus, le cobaye inoculé peut fort bien succomber à une épizootie intercurrente, comme cela arrive souvent dans les élevages de laboratoires. L'autopsie d'un cobaye suspect de bacillose est, elle-même, chose délicate; il importe de vérifier au microscope la présence de bacilles de Koch. Certaines maladies du cobaye, telle que la pseudo-tuberculose de Malassez, peuvent simuler, à s'y méprendre, une tuberculose des organes. On la reconnaître cependant aux caractères suivants : 1° elle est généralement épidémique, affectant tout un lot de cobaye de même provenance; 2° elle a une prédilection pour les ganglions mésentériques et le foie et n'affecte pas la région inguinale inoculée; 3° l'aspect des nodules réguliers et sphériques est d'un blanc nacré très brillant, la teinte des vrais tubercules tire un peu sur le jaune mat, ils sont souvent irréguliers; 4° le pus de ces nodules est fluide, homogène, facile à étaler; le vrai caséum est plus sec et grumeleux; 5° le pus ne contient pas de bacilles de Koch mais des microbes divers (cocci, cocco-bacilles ou bactéries), ne gardant ni le Ziehl, ni le Gram.

Notons enfin que le cobaye ne réagit pas à la tuberculose aviaire.

Valeur comparée de la culture et de l'inoculation

Parmi les avantages de la culture, nous avons insisté sur sa grande sensibilité. En se plaçant à ce point de vue, peut-on considérer que la culture est supérieure à l'inoculation ou non ? Un de ces procédés doit-il supplan-

ter l'autre ou sont-ils appelés à se compléter? Cette question a fait l'objet de nombreuses recherches et l'on peut considérer que puisque tous les auteurs qui se sont attachés à ce problème dans la culture des produits pathologiques suspects de bacillose se sont appuyés, dans la recherche, sur les résultats correspondants de l'inoculation au cobaye.

Loewenstein apportait, dans l'étude de bacillurie, les résultats suivants: la culture est quelquefois positive sans infection concomittante du cobaye; le cobaye est très rarement tuberculeux quand le milieu reste stérile. Dans la majorité des cas, les résultats obtenus sont concordants, mais les résultats de la culture sont beaucoup plus précoces.

Norton, Thomas et Broom, sur 400 échantillons, ne présentant pas de bacilles à l'examen direct obtiennent 151 cultures et inoculations à résultats positifs concordants. Trois cobayes sont tuberculisés, sans qu'il soit apparu des colonies sur des milieux ; par contre, dans seize autres cas, le cobaye est demeuré indemne, tandis que les milieux ensemencés donnaient des cultures.

Mozer trouve des résultats équivalents en partant d'exsudats tuberculeux ortéo-articulaires et ganglionnaires.

Bezançon et Braun trouvent quelques résultats plus favorables à partir de la culture.

Farjot, à partir de 300 crachats homogénéisés à la soude, centrifuge et neutralise tuberculeux 14 cobayes sans avoir de colonie; par contre, dans trois autres cas, les colonies apparaissent mais le cobaye est indemne.

Ananiades et Papanangyron ne trouvent pas la culture en défaut dans plus de 1 % des cas. Elle est plus sensible dans 5 %. Balteanu, Toma et Boerin, tout en trouvant les résultats positifs par une méthode et négatifs par l'autre, ont moins d'échecs avec le cobaye.

Daddi et Lotta, à partir de 365 cas négatifs à l'examen direct, obtiennent 77 résultats positifs concordants,

30 avec le cobaye seulement, 22 avec la culture seulement.

Nasta, Blechmann, Katz-Galati et Gaspa, chez 20 malades atteints de tuberculose rénale confirmée après opération, obtiennent à partir de l'urine et sans qu'il y ait de bacilles de Koch à l'examen direct : 10 cultures positives avec résultat concordant par le cobaye. Deux cobayes ont été tuberculisés et la culture négative ; dans un cas, par contre, il y a eu des colonies et le cobaye est resté indemne.

Saenz et Costil en partant de dilution de bacilles allant de 1/200.000e et mg. de bacilles par centimètre cube, jusqu'à 1/20.000.000e, concluent à la sensibilité plus grande de cobaye.

Ces divers résultats demeurent cependant difficilement comparables entre eux, les milieux et les techniques employés par les divers auteurs ne sont pas les mêmes, il est facile de comprendre que leurs résultats présentent d'assez notables différences.

Néanmoins, on peut conclure que ces deux procédés sont d'une grande sensibilité et si expérimentalement le cobaye se montre un peu plus sensible, il semble que dans certains cas, la culture, à partir des produits pathologiques, peut donner des résultats positifs alors que le cobaye n'est pas tuberculisé ; la réciproque est également vraie.

Ce n'est donc, à partir de ce seul point de vue, que la valeur comparée des deux méthodes doit être établie.

Des considérations pratiques entrent en jeu. La charge et le risque d'un élevage de cobayes ne trouvent pas de contrepartie dans la préparation des milieux. Ceux-ci, d'autre part, permettent de différencier les souches bovines des souches humaines, ils mettent en évidence les souches aviaires qui ne tuberculisent pas le cobaye. Les résultats dans la culture sont enfin sensiblement plus précoces. La culture, par contre, ne nous permet pas d'apprécier la virulence des bacilles, renseignement qui demeure l'apanage de l'inoculation.

Principaux caractères de culture et de virulence permettant l'identification des souches typiques de bacilles tuberculeux humain, bovin, aviaire et paratuberculeux, au moment de l'isolement et sur milieu de Loewenstein. (D'après A. SAENZ et L. COSTIL)

	Caractères culturaux	Virulence		
		Cobaye	Lapin	Poule
Bacille humain typique (eugonique)	Apparition des colonies entre 11 et 29 jours à 37°. Culture eugonique à croissance rapide et facile. Colonies rugueuses, sèches, plissées, à bords irréguliers, augmentant de dimensions jusqu'au développement complet nécessitant 3 à 4 semaines. Colonies en choux-fleurs, de 10 à 15 mm. de diamètre et de 3 à 5 mm. de hauteur, pigmentées en général, s'émulsionnant très difficilement en eau physiologique, n'adhérant pas au milieu. Reportées sur pomme de terre glycérinée, fournit une culture abondante en 3 à 4 semaines, d'aspect rugueux, mamelonné, verruqueux, avec un voile sec, plissé et ridé sur le bouillon dès le premier passage.	Tue le cobaye par tuberculose progressive généralisée; en général, moins virulent que le bacille bovin dysgonique.	Résiste à l'inoculation intraveineuse de 1/100° à 1/1000° de mg. Sacrifié après 2 mois, le lapin peut se trouver porteur de lésions viscérales, localisées, régressives, atteignant surtout les poumons et les reins.	Non pathogène.
Bacille bovin	Apparition des colonies entre 30 et 70 jours à 37°. Culture pauvre, dysgonique, se développant très lentement et difficilement. Colonies lisses, transparentes, visibles au	Provoque une tuberculose généralisée progressive ; plus virulent que le bacille humain.	Par voie veineuse, 1/100° à 1/1000° de mg. détermine la mort du lapin par tuberculose miliaire généralisée, avec lésions nodulaires sur	Non pathogène.

	conservant les caractères de la culture primaire. Pas de voile sur le bouillon glycériné mais poussent en profondeur en formant des flocons.			
Bacille aviaire typique	Apparition des colonies entre 9 et 14 jours à 37°. Culture se développant rapidement et abondamment. Colonies petites, lisses, plus brillantes et humides que celles de bacilles bovins, atteignant leur développement maximum en 2 semaines. Peuvent conserver l'aspect en colonies isolées de dimensions supérieures à celles de bacilles bovins, environ 5 mm. de diamètre ou bien se présentent comme une couche crémeuse, luisante, humide. S'émulsionnent très facilement en eau physiologique et laissées à la température du laboratoire, tendent à se pigmenter. Reportées sur pomme de terre glycérinée, se développent sous forme d'une culture abondante en 15 jours, lisse, unie, très humide; donnent dans le bouillon un trouble homogène qui peut se condenser en flocons.	Non pathogène pour le cobaye, par voie sous-cutanée.	A doses massives, 1 à 10 mg., par voie veineuse tuent la poule en 2 à 3 semaines; forme de tuberculose à allure rapide, septicémique, de type Yersin, caractérisée par l'hypertrophie et la congestion des organes abdominaux sans lésions macroscopiques visibles et des poumons œdémateux et enflammés. Le foie et la rate montrent sur les frottis des bacilles acido-résistants en abondance. 1/10.000e à 1/100.000.000e de mg. produisent en 5 à 6 mois, par voie veineuse, une tuberculose osseuse, polyarticulaire, atteignant souvent les 4 membres de l'animal. Les lésions thoraciques et abdominales manquent le plus souvent et restent dans tous les cas limitées aux poumons et aux reins.	Très virulent pour la poule qu'il tue, à dose de 1/1000e à 1/10.000e de mg. avec les signes classiques de la tuberculose naturelle des oiseaux.
Bacilles para-tuberculeux	Culture se développant à la température du laboratoire, entre 17 et 22°, ou à l'étuve suivant qu'il provient du milieu extérieur ou des animaux à sang chaud et de l'homme. Colonies abondantes en 2 à 5 jours, lisses, polymorphes, fortement pigmentées ou blanc nacré. Croissent facilement entre les températures extrêmes de 15 à 55°.	Non pathogène.	Non pathogène.	Non pathogène.

Principaux caractères de culture et de virulence permettant l'identification des souches atypiques de bacilles des mammifères, aviaires et du nouveau type parasite du cobaye, au moment de l'isolement et sur milieu de Loewenstein. (D'après A. SAENZ et L. COSTIL)

	Caractères culturaux	Virulence		
		Cobaye	Lapin	Poule
Bacille humain dysgonique	Culture primaire dysgonique comme celle de bacilles bovins. Mais dès les premiers repiquages sur pomme de terre glycérinée, donne une culture eugonique typique de bacilles humains.	Même virulence que le bacille humain eugonique.	Résiste impunément à l'inoculation intraveineuse de 1/100e et 1/1,000e de mg.	Non pathogène.
Bacille bovin eugonique	Résultat d'un phénomène de dissociation. La culture primaire, sur milieu de Loewenstein, est dysgonique. mais le réensemencement sur pomme de terre glycérinée est eugonique.	Même virulence que le bacille bovin dysgonique.	Même virulence que le bacille bovin dysgonique.	Non pathogène.

Bacille bovin dysgonique atténué	du bacille bovin dysgonique. Sur pomme de terre conserve cet aspect.	sée atteignant jusqu'à les ganglions voisins du point d'inoculation ou généralisée, à allure chronique évoluant en de longs mois.	pour le cobaye. Après inoculation veineuse de 1/100e à 1/1.000e de mg. l'animal est encore vivant après 8 semaines.	
Bacille bovin eugonique atténué	Souches entretenues depuis longtemps dans les laboratoires. Culture primaire et passages sur pomme de terre glycérinée identiques à ceux du bacille humain.	Tous les degrés de virulence.	1/10e à 1/1.000e de mg. détermine une granulie pulmonaire évoluant en de longs mois. Les lésions sur le foie, la rate et les reins manquent en général.	Non pathogène.
Bacille aviaire eugonique atténué	Culture primaire sur Loewenstein et réensemencements sur pomme de terre glycérinée identiques à ceux du bacille humain eugonique. Résultat d'un phénomène de dissociation.	Non pathogène.	L'inoculation veineuse de 5 à 10 mg. produit en 5 à 7 mois une tuberculose osseuse, polyarticulaire, avec absence de lésions viscérales.	En général non pathogène.
Bacille d'un nouveau type, parasite du cobaye	Culture primaire identique à celle du bacille aviaire typique jusqu'au 15e jour. Tout en conservant l'aspect lisse, les colonies atteignent ensuite de grandes dimensions, 12 à 15 mm. de diamètre. Prennent alors un aspect polymorphe qui les distingue facilement des cultures aviaires.	Non pathogène.	Aux doses de 1/100e à 1/1.000e de mg. n'est pas pathogène, par voie veineuse.	1 à 5 mg. par voie veineuse détermine l'amaigrissement des animaux, puis la mort entre 25 et 40 jours. Le foie et la rate sont hypertrophiés sans lésions nodulaires macroscopiques, mais les frottis montrent d'abondants bacilles acido-résistants.

Troisième Partie

Expérimentation personnelle

CAS PERSONNELS

Nous ne croyons utile de relater ici parmi la cinquantaine d'ensemencement que nous avons pratiqué, que ceux dont les résultats présentent un intérêt particulier.

La presque totalité des produits que nous avons ensemencés, ne présentait, ni après un examen direct prolongé au moins vingt minutes, ni après homogénéisation des bacilles acido-alcoolo-résistants visibles.

Aussi souvent que nous l'avons pu, l'ensemencement a été accompagné d'une inoculation, soit par voie sous-cutanée, soit par voie intra-ganglionnaire.

Tous nos ensemencements, sauf ceux portant sur les liquides céphalo-rachidiens et le sang, qui étaient ensemencés directement, ont été faits sur cinq tubes de milieux de Pétragnani à l'asparagine préparés depuis moins de trois semaines. Après traitements par l'acide sulfurique à 15 % (en poids) pendant une demi-heure, le produit pathologique a été neutralisé à la soude à 30 % en présence de tournesol. Le volume de produit ainsi traité que l'on ensemençait était de 1 à 1/2 cc. par tube selon la consistance, afin qu'il y en ait assez pour que des inclinaisons diverses imprimées aux tubes permettent d'enduire toute la surface de milieu. Les tubes, alors, placés à l'étuve, gardaient une inclinaison très faible sur l'horizontale pour permettre à l'excès de produit ensemencé, de se recueillir dans le fond du tube. L'étuve était réglée à 37°.

Les milieux étaient examinés régulièrement, un premier râclage était opéré le sixième ou le huitième jour, puis répété de deux en deux jours en opérant chaque fois sur un tube différent pour éviter de souiller les cultures par des ouvertures trop fréquentes. Nous n'avons pas cru devoir faire, pour chaque série de cinq tubes, plus de deux à trois râclages. Deux tubes au moins pouvaient ainsi donner des colonies macroscopiques sans avoir été touchés, le nombre des colonies visibles présentait alors un intérêt véritable quant à la richesse en bacilles des produits ensemencés.

Pour les autres tubes, les râclages ayant été réalisés, un repiquage, le nombre des colonies (quand il y en avait), toujours très élevé, ne présentait plus aucune signification.

Nous avons préparé nous-même les milieux dont nous nous sommes servis. Il y a peu à dire sur leur préparation. Les quelques points qui peuvent être précisés à ce sujet sont les suivants : le lait doit être frais, non écrèmé, et non bouilli. Il y a intérêt à préparer à l'avance une solution d'asparagine dans de l'eau. Ce produit n'est, en effet, pas extrêmement soluble et son incorporation à la purée de lait et de fécule se réalise ainsi beaucoup mieux. Il convient d'agiter le flacon placé au bain-marie le plus souvent possible, surtout pendant le premier quart d'heure, où l'agitation doit être, pour ainsi dire, ininterrompue.

Les œufs, avant d'être cassés, seront soigneusement brossés à l'eau savonneuse, puis immergés dans un bain d'alcool pendant 1/4 d'heure. L'opérateur prendra également soin de se passer les mains à l'alcool. Après avoir brisé la coque, les œufs sont versés dans une bouteille de limonade stérile, garnie de billes de verre pour faire un mélange homogène entre le blanc et le jaune. Nous croyons devoir recommander cette pratique qui permet de faire le mélange à l'abri de l'air, d'éviter ainsi de nombreuses souillures et le mélange obtenu est extrêmement homogène, d'où obtention de milieux lisses sans

aucune irrégularité de forme ou de composition. Une seule difficulté est l'introduction des œufs dans les bouteilles, il faut utiliser un entonnoir stérile à tige large et écraser les jaunes dans l'entonnoir avec un agitateur stérile.

Pour toutes les manipulations qui nécessitent un passage à l'air, ouverture des œufs, filtrage de l'omelette sur gaze, il est prudent d'opérer entre deux becs Bunsen allumés; le passage dans le coagulateur ne réalisant, en effet, qu'une stérilisation très relative des milieux et il est toujours décevant de voir des milieux fraîchement préparés se couvrir de moisissures qui trouvent là un terrain d'élection.

Après coagulation, on sera quelquefois surpris de voir que la teinte finale peut être assez variable, suivant que les milieux sont plus ou moins acides, la teinte varie de vert franc au jaune à peine teinté de vert. Ce n'est là qu'un détail sans trop grande importance, il ne nous a pas paru que les cultures présentent, dans les divers cas, des différences sensibles. D'autre part, la correction du pH de ces milieux serait assez difficile à réaliser.

Nous croyons utile de recommander de râcler quelques tubes après avoir contrôlé la stérilité par le passage à l'étuve. Les bacilles acido-alcoolo-résistants ne sont pas si rares et leur présence lors du râclage ultérieur pourrait donner lieu à la rencontre de ces micro-colonies non repiquables; ce qui ne représente pas une cause d'erreur pour un observateur averti et prudent, mais au sujet desquelles l'esprit doit toujours être mis en garde.

Observation I

(Inédite, due à M. le Professeur Jeanbrau)

Tuberculose urinaire avec pyurie bacillaire

Ensemencement positif le neuvième jour

Gir... Augustin, 38 ans, entre dans le service d'Urologie le 26 janvier 1937, pour tuberculose rénale contrôlée au Val-de-Grâce.

A l'examen: Urines purulentes avec bacilles de Koch. Les examens pratiqués les jours suivants permettent de conclure à une tuberculose rénale gauche.

Néphrectomie par M. Jeanbrau, le 12 février 1937.

Examen de la pièce: Tuberculose ulcéro-caséeuse qui a détruit le rein presque complètement.

Le 6 février 1937, nous ensemençons sur milieu de Pétragnani à l'asparagine le culot de centrifugation de cette urine, préalablement traité par l'acide sulfurique à 15 % et neutralisé à la soude en présence de tournesol. Un examen direct préalable avait montré la présence de pus, et de quelques bacilles de Koch.

Le 14 février, sans avoir pratiqué de râclage du milieu, on voit apparaître à sa surface de nombreuses petites colonies punctiformes, sèches et blanches. L'examen direct, après coloration de ces colonies, montre qu'il s'agit bien de bacilles de Koch typiques. Par la suite, les colonies se développent abondamment et recouvrent toute la surface du milieu.

Conclusion. — Résultats macroscopiquement visibles le neuvième jour.

Observation II

(*Inédite,*
recueillie dans le service de M. le Professeur Jeanbrau)

Tuberculose urinaire avec pyurie bacillaire

Ensemencement positif le onzième jour

B... Em., 32 ans, entre le 17 février 1937, à la Clinique urologique de Montpellier pour cystite spontanée remontant à trois mois.

A l'examen: 1° Urines troubles purulentes, contenant des bacilles de Koch;

2° Les examens urologiques permettent de conclure à une tuberculose rénale gauche avec altération considérable du rein qui concentre l'urée à 4 gr. 50 pour 1000, tandis que le rein droit la concentre à 29 gr. 20 p. 1000.

Néphrectomie gauche par E. Truc, le 12 mars 1937. L'examen de la pièce montre l'existence de trois cavernes dans le rein, chacune du volume d'une grosse noix verte.

Le 18 février 1937, nous ensemençons sur milieu de Pétragnani à l'asparagine le culot de centrifugation de cette urine, préalablement traité par l'acide sulfurique à 15 % et neutralisé à la soude en présence de tournesol.

Le 26 février, recherche des micro-cultures par râclage du milieu: présence de quelques éléments acido-alcoolo-résistants.

Le 1er mars, apparition des premières colonies nettement visibles.

Conclusion. — Présence de micro-colonies dès le sixième jour. Résultats macroscopiquement visibles le onzième jour.

Observation III

(*Inédite,*
recueillie dans le service de M. le Professeur Jeanbrau)

Tuberculose urinaire confirmée par l'ensemencement et l'inoculation

B... Jules, 37 ans, entre le 19 avril 1937 à la Clinique urologique de Montpellier pour cystite spontanée.

A l'examen: 1° Urines purulentes à bacilles de Koch; 2° Analyse des crachats: bacilles de Koch.

Un ensemencement antérieur de cette urine sur bouillon gélosé ayant montré qu'il n'y avait pas de germes d'infection secondaire, à côté des bacilles de Koch, nettement visibles à l'examen direct, le culot de centrifugation est directement ensemencé sur milieu de Pétragnani à l'asparagine, le 20 avril 1937.

Le 5 mai, apparition de colonies à la surface du milieu.

Une inoculation par voie intra-ganglionnaire ayant été réalisée au même moment que l'ensemencement, l'animal est sacrifié dès l'apparition des colonies.

On note: très gros ganglion cervical avec caséum, le foie et la rate hypertrophiés présentent de nombreuses lésions tuberculeuses.

Conclusion. — Résultats concordants pour la culture et le cobaye le quatorzième jour.

Observation IV

(*Inédite,* due à M. le Professeur Jeanbrau)

Tuberculose urinaire sans bacillurie
Ensemencement positif

B... Pierre, 28 ans, entre à la Clinique urologique de Montpellier le 9 février 1937, pour cystite spontanée.

A l'examen: Urines purulentes sans microbes à l'examen direct. Epididymite gauche ayant les caractères d'une localisation tuberculeuse.

Le 12 février 1937, nous ensemencons sur milieu de Pétragnani à l'asparagine le culot de centrifugation de cette urine préalablement traité par l'acide sulfurique à 15 % et neutralisé ensuite à la soude en présence de tournesol.

Une partie du produit traité est examinée après coloration de Ziehl et il n'est pas possible de mettre en évidence des bacilles de Koch, même après un examen prolongé.

Le 20 février, la recherche des micro-cultures par râclage des milieux permet de voir quelques bacilles acido-alcoolo-résistants groupés par petits amas, et d'aspect typique.

Les premières colonies macroscopiquement visibles apparaissent le 26 février.

Un deuxième ensemencement le 18 mai après examen direct à nouveau négatif est suivi de micro-colonies le 27 et de colonies macroscopiquement visibles le 31 mai.

Une inoculation par voie intra-ganglionnaire selon la technique de Ninni est pratiquée simultanément au deuxième ensemencement. L'animal, sacrifié le 16 juin, en bonne santé apparente, présente un ganglion cervical légèrement hypertrophié avec caséum et quelques lésions de la rate et du foie.

Les résultats ont donc été obtenus dès le huitième

jour, par la recherche des micro-cultures; le quatorzième, par l'apparition des macro-colonies, celles-ci au nombre de deux et de quatre pour les deux tubes de milieux qui n'avaient pas été raclés. Ce n'est qu'au bout d'un mois, et alors que le cobaye était en bonne santé apparente que l'on a pu déceler les lésions par le sacrifice anticipé de l'animal.

Observation V

(*Inédite*, recueillie par le Docteur Héran)

Orchi-épididymite bacillaire sans pyurie ni bacilluric
Ensemencement positif

A..., consulte le Docteur Héran en février 1937 pour orchi-épididymite tuberculeuse droite avec prostatite et vésiculite et signes associés de cystite.

Après castration, qui confirme la nature tuberculeuse des lésions, disparition des lésions prostatiques ainsi que la pollakiurie et des douleurs à la miction.

Le 14 février, nous avons ensemencé le culot de centrifugation de cette urine, directement sur milieu de Pétragnani. Noter que ce culot particulièrement minime ne présentait ni pus ni germes à l'examen direct.

Le 12 mars, la recherche des micro-cultures montre, par râclage du milieu, la présence de quelques bacilles de Koch.

Le 25 mars, apparition des macro-colonies au nombre total de 6 pour trois tubes qui n'avaient pas subi de râclage.

Conclusion. — Diagnostic positif au bout de dix-huit jours par la recherche des micro-cultures, et de trente-et-un jours par les macro-cultures.

Observation VI

(*Inédite*, recueillie dans le service de M. le Professeur Margarot)

Epanchement tuberculeux de la plèvre sans bacilles de Koch à l'examen direct

Ensemencement positif

M... Isabelle, 40 ans, soignée dans le service pour cirrhose spécifique, avec ascite, pleurésie et péritonite tuberculeuse. Mauvais état général.

Plusieurs ponctions de la plèvre et de l'ascite, pratiquées entre le 25 janvier 1937 et le 1er juin, ramènent un liquide citrin. L'examen de ces liquides montre une réaction lymphocytaire de 90 à 96 %. La recherche directe du bacille de Koch est négative ainsi que l'inoculation. L'examen des crachats est également négatif.

Le 27 *avril,* ensemencement sur milieu de Pétragnani à l'asparagine du culot de centrifugation du liquide de ponction de la plèvre, après traitement à l'acide sulfurique à 10 % suivi de neutralisation à la soude.

Le 31 *mai,* apparition de deux colonies sur un seul tube de milieu.

Un cobaye, qui avait été inoculé le 10 avril est sacrifié le 31 mai. Il présente des ganglions inguinaux et lombaires hypertrophiés, avec caséum, un seul nodule tuberculeux sur la rate. Il n'y a pas de lésions du foie et des poumons. Un autre cobaye qui avait été inoculé le 13 mars, était mort le 10 avril sans présenter de lésions.

Conclusions. — Positives au bout de 34 jours.

Observation VII

(*Inédite,*
recueillie dans le service de M. le Professeur Jeanbrau)

Tuberculose génitale et prostatique
chez un tuberculeux pulmonaire
sans pyurie, ni bacillurie

Ensemencement positif

C... Louis, 22 ans, entre à la Clinique urologique de Montpellier le 3 février 1937 pour épididymite droite torpide. Il est envoyé du sanatorium de Bellevue où il est en traitement pour tuberculose pulmonaire.

A l'examen : 1° Urines limpides, dans lesquelles l'analyse cyto-bactériologique n'a décélé ni pus ni microbes, ni bacilles de Koch. L'ensement sur les milieux habituels st resté stérile ;

2° Epididymite droite suppurée et fistulisée, présentant tous les caractères d'une localisation tuberculeuse ;

3° Prostate infiltrée à droite ;

4° Reins non perceptibles ;

5° Absence de phénomènes de cystite.

La patient a été épididymectomisé dans la suite et l'opération a confirmé la nature tuberculeuse des lésions.

Le 2 juin, ensemencement sur milieu de Pétragnani à l'asparagine, du culot de centrifugation des urines préalablement traité par l'acide sulfurique à 15 %, suivi de neutralisation à la soude en présence de tournesol.

La recherche des micro-colonies par râclage des milieux montre quelques bacilles le 19 juin.

Le 27, apparition de macro-colonies.

Conclusion. — Le diagnostic positif est établi le dix-septième jour par recherche des micro-cultures et le vingt-cinquième par apparition des macro-colonies.

Observation VIII

(*Inédite,*
dûe à l'obligeance de M. le Professeur Jeanbrau)

Pyurie sans bacilles de Koch.

Ensemencement suivi de micro-colonies non repiquables.

Diagnostic de tuberculose écarté

P... André, 22 ans, entre le 13 janvier 1937 à la Clinique d'urologie de Montpellier pour séquelle de cystite survenue cinq mois après une blennoragie.

A l'examen: 1° Urines purulentes, sans bacilles de Koch, contenant quelques cocci à Gram positif; 2° L'examen cystoscopique décèle au sommet de la vessie une petite ulcération blanchâtre, suspecte de tuberculose.

L'ensemencement du culot de centrifugation, le 2 février 1937, sur milieu de Patragnani à l'asparagine, donne, le 10 février, par la recherche des micro-cultures, quelques bacilles acido-alcoolo-résistants.

Le 16 février suivant, nouvelle recherche des micro-cultures: on trouve encore des bacilles acido-résistants.

Le 25 février suivant, nouvelle recherche des micro-cultures; présence de très rares bacilles acido-alcoolo-résistants, ressemblant morphologiquement au bacille de Koch, à Gram positif. Les macro-colonies n'ont jamais apparu.

Conclusion. — Etant donné que l'on se trouve en présence de micro-colonies non repiquables, il n'y a pas lieu de conclure à l'existence d'une bacillose.

Observation IX

Dans cette observation, nous groupons tout un ensemble d'ensemencements d'origine diverses mais tous souillés par du pyocyanique. Il s'agissait de pansements imbibés de pus et colorés en bleu par le pigment du germe d'infection secondaire.

Ces pansements imbibés d'eau étaient exprimés au mortier et le culot de centrifugation de cette eau de lavage traité à l'acide sulfurique à 15 % pendant une demi-heure, puis neutralisé à la soude à 30 % en présence de tournesol. Le produit était alors ensemencé sur milieu de Pétragnani à l'asparigne.

Au bout de vingt-quatre heures, les milieux étaient recouverts par une épaisse couche de pyocyanique.

Celui-ci, repiqué sur bouillon gélosé et traité à nouveau par l'acide à 15 % pendant une demi-heure ne se reproduisait plus ni sur bouillon gélosé, ni sur milieux : l'œuf.

Il y a là un cas particulièrement remarquable de résistance à l'acide de germes issus directement de produits pathologiques. Ce caractère paraît d'ailleurs assez fragile puisqu'il ne persiste pas après repiquage.

CONCLUSIONS

Conclusions

Sans insister plus longuement sur les qualités pratiques de la culture des produits pathologiques d'origine bacillaire, il nous paraît utile de présenter nos conclusions suivant des circonstances dans lesquelles se présentent les produits à examiner :

1er *cas.* — L'examen direct des produits pathologiques révèle la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants. Les signes cliniques imposent un diagnostic de bacillose. Le rôle du laboratoire se borne à donner une confirmation. Malgré toutes les restrictions dont nous avons entouré la valeur de l'examen direct, celui-ci suffit pour engager le laboratoire à donner une réponse affirmative. La culture n'intervient que pour apporter une preuve supplémentaire et préciser la souche du bacille.

2me *cas.* — L'examen direct des produits pathologiques ne révèle pas la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants, les signes cliniques orientent vers un diagnostic de bacillose. La culture s'impose. Dans un minimum de temps et avec une remarquable sensibilité, elle nous apporte des renseignements dont la précision est supérieure à l'inoculation. D'autre part, la simplicité de la méthode, son avantage pratique la feront préférer à l'inoculation au cobaye plus longue dans ses résultats et qui entraîne, pour le laboratoire, la charge et le risque d'un élevage.

3me *cas.* — L'examen direct des produits pathologiques révèlent la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants. Les signes cliniques ne justifient pas cette présomption de bacillose, la culture est nécessaire pour contrôler la nature tuberculeuse de ces bacilles, elle ne suffit pas, il doit être fait appel simultanément à la méthode d'inoculation qui, seule, nous renseignera sur le caractère de virulence de ces bacilles.

De cet ensemble de considération, il résulte que les récents et très grands progrès que les méthodes de culture ont apporté au diagnostic bactériologique de la tuberculose, justifient et nécessitent de plus en plus une collaboration étroite entre la clinique et le laboratoire. Le diagnostic médical est un tout que l'on ne saurait impunément diviser par des cloisons étanches. Le domaine des investigations de la clinique demeure limité à des constatations que la rigueur scientifique est impropre à codifier. Cette même rigueur scientifique qui doit être le propre des examens de laboratoire, les enserre dans des vues étroites qui ne leur donne pas à elles seules la portée utile et biologique qui doit jaillir de leur collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

ANANNIADES ET PAPANARGYRON. — *C. R. Soc. Biol.* 1933, T. CXII, p. 436.

ABDERHALDEN. — *Munch. Med. Woch.* 1913, LX, p. 1641.

D'ANTONA ET MAZETTI. — *Atti R. Acc. dei Fisiocritici Siena* 1934 N° 4, p. 95.

ARLOING. — *C. R. Acad. d. Scien.* 1898, CXXVI, pages 1319, 1388-1550.

BACCANU. — *Rev. Tuberc.* mars 1936, p. 347.

BALTEANU TOMA BOERIN. — *Soc. Biol. Jassy* Juil. 32 ; *in C. R. Soc. Biol.* T. CXI, p. 214.

BERGERON. — *Rev. Tuberc.* 1932. T. XIII, p. 509.

BERGERON ET MEZIERES. — *Rev. Tuberc.* Oct. 1935, p. 917.

BER. — *Soc. Biol.* Varsovie Avril 33 ; *in C. R. Soc. Biol.* 1933 T. CXIII, p. 1269.
et WIADORMACI WETER, 1933, T. XV, N° 155.

BESREDKA. — *C. R. Acad. des Scien.* 1913, T. CLVI, p. 1633.

BEZANÇON ET BRAUN. — *C. R. Soc. Biol.* 1936, T. CXXII, p. 772.

BEZANÇON ET BRAUN. — *Rev. Tuberc.* 1932. T. XIII, p. 516.

BEZANÇON BRAUN ET MEYER. — *Bull. Acad. Med.* 1936, T. CXV, page 857.

BEZANÇON BRAUN ET MEYER. — *Bull. Acad. Med.* 1936, T. CXV, page 260.

BEZANÇON BRAUN ET MEYER. — *Presse médicale*, Mai 1934, page 745.

BONINO. — *Boll. della Sez. Italia di Soc. Int. di Microb.* 1933 T. V, p. 111.

BONINO. — *Giorn. Batt. e Imm.* 1934, T. XII, p. 192.

BONINO. — *Giorn. Batt. e Imm.* 1934, T. XVI, p. 726.

BOSSAN ET BAUDY. — *C. R. Soc. Biol.* 1922. T. LXXXVII, p. 958.

BRAUN. — *Klin. Woch.* 1935. T. XIV, p. 703.

BRUNI. — *Riv. Sanit. Sicil.* 1935. N° 2, p. 100.

BRUNYNOHE ADANT. — *Soc. Belg. de Biol.* 32; *in C. R. Soc. Biol.* T. CXI, p. 1051.

CARNOT LAVERGNE FIEHRER. — *C. R. Soc. Biol.* 1935. T. CXIX, page 809.

COLOMBINO. — 35ème *Congrès Français d'Urologie Paris,* Octobre 1935.

COSTIL. — *Thèse de médecine Paris* 1935.

COURCOUX ET BERGERON. — *Rev. Tuberlc.* 1934. T. II, p. 56.

COURMONT. — *Journal Médical Français* 1933, XXII, p. 148.

COURMONT. — *Journal Médical Français* 1933, XXII, p. 173.

CUMMIN WILLIAMS. — *Tubercl.* 1933. T. XV, p. 53.

DADDI LOTTA. — *Controla Tuberculosi* 1935 N° 6, p. 577.

DARANYI. — *Deut. Med. Woch.* 1932. T. IL, p. 553.

DARZINE. — *Ann. Inst. Past.* 1932. T. XLIX, p. 743.

DEIST. — *Klin. Woch.* 1933. T. XII, p. 26.

DORSET. — *Journ. of Americ. Med.* 1902, p. 555.

DUFFOUR ET FABRE. — *C. R. Soc. Biol.* 1934. T. CXVII, p. 923.

DUJARRIC DE LA RIVIERE. — *C. R. Soc. Biol.* 1926. T. VC, p. 1234

ELISENDRATH. — *Thèse de Paris* 1933.

ELISENDRATH. — 33ème *Congrès Français d'Urologie Paris* Octobre 1932.

FARJOT. — *Soc. Biol. Lille* 33; *in C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXII page 987.

FARJOT. — *Soc. Biol. Lille* 33; *in C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXIII page 770.

FAVIA. — *Diagn. Tecn. di Lab.* 1934. N° 10, p. 801.

FOULLERTON ET HILLIER. — *Brit. Med. Journ.* 1901, p. 774.

GAINSKI. — *C. R. Soc. Biol.* 1934. T. CXV, p. 13.

GAINSKI. — *C. R. Soc. Biol.* 1934. T. CXVI, p. 1276.

GRAZIOSI. — *Riv. Pat. Clin. d. Tuber.* 1934. N° 2, p. 157.

GRIFFITH. — *Tubercl.* 1933. T. LI, p. 53.

HAUDUROY. — *C. R. Soc. Biol.* 1932. T. CX p. 559.

HELM. — *Centralblat f. Bakt.* 1933. T. CXXVII, p. 73.

HOHN. — *Centralblat f. Bakt.* 1926. T. XCVIII, p. 460.

HOHN. — *Centralblat f. Bakt.* 1927. T. CIII, p. 342.

HOHN. — *Centralblat f. Bakt.* 1929. T. CXIII, p. 342.

HOHN. — *Centralblat f. Bakt.* 1931. T. CXXI, p. 488.

HUTH (VON) ET LIEBERTHAL. — *Surg. Gynec. et Obst.* 1930. T. L, p. 585.

ISAAC (Georges). — *La Médecine* 1934 Mai, p. 373.

JOUSSET. — *Arch. de Medec. Exper.* 1934. T. XVI, p. 521.

JOUY. — *Thèse de Médecine, Paris* 1934.

KOCH. — *Mitt. q. d. Kais. Gesundh.* 1884. T. II, p. 66.

KLIMMER. — *Berlin Tierarrzth. Woch.* 1932. Nov. p. 737.

KNORR. — *Arch. f. Hyg.* 1932. T. CVIII, p. 181.

LIVERANI. — *C. R. Soc. Biol.* 1934. T. CXV, p. 133.

LOEWENSTEIN. — *Deut. Med. Woch.* 1930. T. XXIV, p. 1010.

LOEWENSTEIN. — *Wien. Klin. Woch.* 1924, p. 231.

LOEWENSTEIN. — *Centralblatt f. Bakt.* 1932. T. CXXIII, p. 510.

LIMOUSIN. — *Ann. Inst. Past.* 1922. T. XXXV, p. 558.

LOMINSKI. — *C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXIII, p. 1333.

LUBENAU. — *Hygien. Rundschau.* 1907. T. XVII, p. 1456.

MARTIN. — *Bull. Soc. Chir. Toulouse* 1932, Sept., N° 10.

MALMEJAC. — *Presse Médicale,* 1909, p. 665.

MATEFY. — *Med. Klin.* 1923 T. XIX, p. 725.

MANTOUX. — *C. R. Acad. Scien.* 1908. T. CXXXXVII, p. 355.

MENTON. — *Brit. Med. Journ.* 1934, février, p. 281.

MERTEN. — *Centralblatt f. Bakt.* 1933. T. CXXVIII, p. 488.

MEYER (André). — (Préface de Bezançon). *La tuberculose occulte.* Legrand Paris, 1935.

MORIZ WEISS. — *Mediz. Klinik.* 1910. T. VI, p. 1661.

MOZER. — *Ann. Inst. Past.* 1932. T. XLVIII, p. 725.

NASTA BLECHMANN KATZ-GALATI ET GASPAR. — *Presse Médicale.* 1936 Mai, p. 820.

NASTA BLECHMANN GASPAR BACANU FRIEDMANN. — *Soc. Biol.* Bucarest 34; *in C. R. Soc. Biol.* 1934. T. CXVII, p. 1134

NEGRE ET TROISIER. — *C. R. Soc. Biol.* 1935. T. CXIX, p. 820.

NEGRE ET TROISIER. — *Presse Médicale* 1935. Nov. p. 1745.

NEGRE ET BRETEY. — *C. R. Soc. Biol.* 1935. T. CXVIII, p. 1182.

NEGRE ET BRETEY. — *Ann. Inst. Past.* 1935. T. LV, p. 273.

NINNI. — *C. R. Soc. Biol.* 1931. T. CVII, p. 618.

NINNI ET BRETEY. — *C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXII, p. 249.

NOCARD ET ROUX. — *Ann. Inst. Past.* 1887. T.I, p. 19.

NORTON THOMAS ET BROOM. — *Amer. Rev. of Tuberc.* 1932. T. XXV. p. 378.

PETRAGNANI. — *Bull. Istit. Sierot. Milan.* Juin 1936.

PETROFF. — *Journ. of Exper. Med.* 1915. T. XXII, p. 38.

PAWLOWSKY. — *Ann. Inst. Past.* 1888. T. II, p. 303.

PEZZANGORA BACCANU. — *C. R. Soc. Biol.* 1935. T. CXIX, p. 934.

DI PIERRO. — *Diagn. e Tecn. Di Lab.* 1935. N° 4, p. 265.

PIRQUET (von). — *Deut. Med. Woch.* 1907. T. XXXIII, p. 865.

PLUM. — *Maunedskr. for Dyrlaeger.* 1934.

POLOTIVA ET TRIGUSSE. — *Presse Médicale*, 1935 Oct. p. 1585

PROCA. — *Soc. Biol. Bucarest; in C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXIV page 280.

PROCA. — *Soc. Biol. Bucarest; in C. R. Soc. Biol.* 1932. T. CX page 652.

PROCA. — *Soc. Biol. Bucarest; in C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXII page 79.

RIEMSDIJK. — *Centralblatt f. Bakt.* 1932. T. CXXIV, p. 394.

ROBIN BRION COSSON. — *Bull. Acad. Vet. de France*, 1934 T. VII, p. 51.

ROGER. — *Soc. Med. des Hopit.* 1909 Juillet.

ROUDOIN. — *Bol. Ist. Sier. Milan* 1935, N° 4, p. 386.

SAENZ. — *C. R. Soc. Biol.* 1931. T. CVII, p. 1455.

SAENZ. — *C. R. Soc. Biol.* 1932. T. CXII, p. 434.

SAENZ ET COSTIL. — *C. R. Soc. Biol.* 1932. T. CX, p. 1189.

SAENZ ET COSTIL. — *C. R. Soc. Biol.* 1932. T. CXI, p. 770.

SAENZ ET COSTIL. — *C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXII, p. 1302.

SAENZ ET COSTIL. — *C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXIII, p. 50.

SAENZ ET COSTIL. — *C. R. Soc. Biol.* 1934. T. CXV, p. 257.

SAENZ ET COSTIL. — *C. R. Soc. Biol.* 1934. T. CXV, p. 584.

SAENZ ET COSTIL. — *Le Diagnostic Bactériologique de la Tuberculose*. Masson, Paris 1936.

SAENZ ET COSTIL. — *La Médecine*, 1936 Mai, p. 382.

SAENZ ET EISENDRATH. — *Ann. inst. Past.* 1932. T. XLIX, p. 608

SAENZ ET EISENDRATH. — *C. R. Soc. Biol.* 1932. T. CIX, p. 1260.

SAENZ EISENDRATH, COSTIL SADETTIN. — *C. R. Soc. Biol.* 1935, T. CXIX, p. 956.

SAENZ DE MIGUEL COSTIL. — *C. R. Soc. Biol.* 1935. T. CVIII, page 410.

SAUTON. — *C. R. Acad. Scien.* 1912. T. CLV. p. 1860.

SHAFFER. — *Amer. Rev. of Tuberc.* 1933. T. XXVIII, p. 259

SANCTIS. — *Boll. Ist. Sierot. Milan*, 1935. N° 1, p. 60.

SAYE DUFFOURT FABRE. — *Rev. Tuberc.* 1935. p. 441.

SCHWABACHER. — *Med. Res. Council. Spec. Rep. Series* 1933. T. CLXXXII, p. 124.

SEVERI. — *Minerva Medica.* 1934. N° 9, p. 275.

SKYBA. — *Bratisl. Lekar.* 1933. T. I, p. 66.

SVANBERG. — *Skandinakoski Vet. Tiedskr. Arg.* 1934. T. XXIV.

TONIETTI ET LUZATTO. — *Lotta contro la Tuberculosi*, 1934. T. IV, p. 616.

VALTIS PAISEAU VAN DEINSE. — *C. R. Soc. Biol.* 1932. T. CXI, page 300.

VAURS. — *Revue de la Tuberculose* 1934. T. II, p. 5.

VAURS. — *Centre Medical* 1934, N° 5.

VAURS. — *Le progrès médical* 1934. T. XXI, p. 881.

VAURS. — *Journal Medical Français* 1935, N° 5.

VERNES. — *Travaux et publication de l'Institut prophylactique* 1926. fasc. 4.

WALKER. — *Centralblatt f. Bakt.* 1935. T. CXXXIV. p. 99.

WALTERS ET DEHMEL. — *Centralblatt f. Bakt.* 1932. T. CXXIV, page 199.

WANG. — *C. R. Soc. Biol.* 1932. T. CXI, p. 619.

WANG LIANG. — *C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXII, p. 770.

WARNERY. — *C. R. Soc. Biol.* 1932. T. CXI, p. 575.

WARNERY. — *C. R. Soc. Biol.* 1933. T. CXIII, p. 319.

WARSCHAWSKY. — *C. R. Soc. Biol.* 1934. T. CXVI, p. 1233.

WILDBOLZ. — *Corr. Blatt. f. Schu. Aertze* 1919. T. XXII, p. 793.

WOLFF EISNER. — *Soc. Med. de Berlin.* 1907, *Juin.*

WIESERMANN ET DOAN. — *Amer. Rev. of Tuberc.* 1934. T. XXX, page 33.

ZACH. — *Boll d. Soc. Int. d. Microb.* 1933. T. V, p. 179.

ZIEHL NEELSEN. — *Deut. Med. Woch.* 1882. T. VIII, p. 451.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT PROPOS 9

INTRODUCTION 11

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — *Recherche du germe* 17

L'examen direct 17

L'homogénéisation 21

L'inoculation 22

CHAPITRE II. — *Recherche des anticorps* 24

Recherche des anticorps *in vitro* 24

Recherche des anticorps *in vivo* 28

CHAPITRE III. — *Examens secondaires* 31

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — *Les milieux de culture* 37

Historique 38

Les divers milieux 41

Sensibilité comparée des divers milieux 45

CHAPITRE II. — *La méthode d'isolement à l'acide sulfurique* 51

Action de l'acide sur les bacilles 52
Action du sulfate de soude 54
Techniques d'isolement des divers produits pathologiques 55

CHAPITRE III. — *Les résultats* 63
La microculture 64
Les macro-colonies 67
Valeur des résultats 73

CHAPITRE IV. — *L'inoculation, valeur comparée avec la culture* 74
Les techniques d'inoculation 74
Valeur comparée 77

TROISIEME PARTIE

Expérimentation personnelle 87
CONCLUSIONS 101
BIBLIOGRAPHIE 103

En ma qualité de Censeur de tour, j'ai lu la thèse ayant pour titre :

La Culture du Bacille de Koch appliquée au diagnostic de la Tuberculose

par René DELMAS

Je pense que la Faculté peut en permettre l'impression.

Montpellier, le 17 Février 1938

Le Professeur, LISBONNE

Vu :

Montpellier,
le 18 Février 1938

Le Doyen,
EUZIERE

Vu et permis d'imprimer :

Montpellier,
le 19 Février 1938

Le Recteur,
PARISELLE.